UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
JULIANA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO ÔMEGA-3 E DO ÁCIDO FÓLICO, ISOLADOS OU EM COMBINAÇÃO, EM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Tubarão
2018

JULIANA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO ÔMEGA-3 E DO ÁCIDO FÓLICO, ISOLADOS OU EM COMBINAÇÃO, EM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

LINHA DE PESQUISA: Neurociências

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Josiane Somariva Prophiro, Dra.

Coorientadora: Profa. Jucélia Jeremias Fortunato, Dra.

Tubarão

2018

UNISUL
UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Avaliação do potencial neuroprotetor do ômega-3 e do ácido fólico, isolados ou em combinação, em modelo animal de transtorno do espectro autista

JULIANA DE OLIVEIRA
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 30 de novembro de 2018.

Doutora Josiane Somariva Prophiro (orientador) _____

Doutora Silvia Rosane Parcias (Avaliador externo - UDESC) _____

Doutora Fabiana Schuelter Trevisol (avaliador interno) _____

Professora Doutora Fabiana Schuelter Trevisol
COORDENADORA ADJUNTA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Oliveira, Juliana de, 1980-
O45 Avaliação do potencial do ômega-3 e do ácido fólico, isolados ou em combinação, em modelo animal de transtorno do espectro autista / Juliana de Oliveira ; -- 2018.
100 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora : Profa. Dra. Josiane Somariva Prophiro.
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Gravidez – Aspectos nutricionais. 2. Mães – Nutrição. 3. Transtorno do Espectro Autista. 4. Ácidos graxos Ômega-3. 5. Ácido Fólico. I. Prophiro, Josiane Somariva. II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 614.577

Ficha catalográfica elaborada por Francielli Lourenço CRB14/1435

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais por nunca terem desistido de mim e sempre acreditarem nos meus sonhos.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos”. (Provérbios 16:9)

RESUMO

Introdução: O período gestacional é uma fase na qual as necessidades nutricionais são elevadas, decorrentes dos ajustes fisiológicos da gestante e das demandas de nutrientes para o crescimento fetal. Fatores genéticos, infecções, inflamações e a má nutrição materna durante o período gestacional e início da vida pós-natal podem promover disfunções celulares e contribuir para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e neurológicos, como o transtorno do espectro autista (TEA). Considerando que o TEA possa estar relacionado com alterações no neurodesenvolvimento decorrentes de um processo inflamatório, abordagens terapêuticas como a suplementação de ácido graxo poliinsaturado (AGP) ômega 3 (ω-3) e ácido fólico (AF), isoladamente ou combinado, no período pré-natal ou periconcepcional, podem representar alternativas não farmacológicas associadas à prevenção.

Objetivo: Avaliar os efeitos da administração de AGP ω-3 e AF, isolados ou em combinação, sobre a neuroproteção de ratos submetidos a um modelo experimental de TEA.

Método: O período de suplementação compreendeu uma fase de adaptação de 15 dias antes do acasalamento e estendeu-se durante as fases de gestação e lactação até o dia pós-natal (PND) 21 dias dos filhotes. Os testes comportamentais foram realizados nos PND45 e PND52, posteriormente os animais foram submetidos ao protocolo de morte indolor assistida e as estruturas de interesse (córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo) foram isoladas para a análise dos níveis de dano oxidativo em lipídios e proteínas.

Resultados: A suplementação materna com o AGP ω-3 e AF, isolados ou associados, foram capazes de reverter parâmetros de estereotipia e interação social, especialmente nos animais machos, e melhora da memória de habituação nas fêmeas. Os mesmos protocolos de suplementação reverteram os danos oxidativos em lipídios e proteínas provocados pelo lipopolissacarídeo (LPS) administrado prenatalmente.

Conclusão: Os resultados sugerem o papel neuroprotetor do AGP ω-3 e do AF, isolados ou em combinação, tanto em animais machos quanto em fêmeas, submetidos ao modelo pré-clínico de TEA.

Descritores: Suplementação materna. Transtorno do Espectro Autista. Ômega-3. Ácido Fólico.

ABSTRACT

Introduction: Gestational period is a phase in wich nutrional requiriments are elevated, due the pregnant phisiological adjustments and fetal growth nutrition demands. Genetic factors, infections, inflammations as well as maternal bad nutrition during gestational period and postnatal life may promote cellular disfunctions and contribute to development of psychiatric and neurologic disorder, as Autistc Spectrum Disorder (ASD). Considering that ASD is related to neurodevelopment alterations caused by inflammatory process, therapeutic approaches such as ω3 and folic acid supplementation, alone or in combination, wether in postnatal or in periconcepcional period, may represent nonpharmacologic alternative, associated to prevention.

Objective: To evaluate the effects of administration of ω3 and folic acid, alone or in combination, in neuroprotection of rats submitted to ASD experimental model.

Methods: The supplementation period comprehended a 15 days adaptation stage before mating and it was extended through gestation and lactation stages, that is to say, until postnatal day (PND) 21 puppies days. Behavioral tests have been conducted in PND45 and PND 52, posteriorly, animals were submitted to painless assisted death protocol and structures of interest (prefrontal cortex, hippocampus and cerebellum) were isolated and storaged to oxidative lipid damage level and protein oxidative damage analisys.

Results: Maternal supplementation with ω-3 and pholic acid, alone or in combination, were capable of reversing parameters of stereotypy and social interaction, mainly in male animals, and memory improvement in female memory of habituation. Same protocols of supplementation reverse oxidative damage in lipid and proteins caused by lipopolysaccharide (LPS) administrated prenatally.

Conclusion: Results suggests the neuroprotector role of ω-3 and folic acid, alone or in combination, both in male and in female animals, submitted to preclinical model of TEA.

Keywords: Maternal supplementation. Autistic Spectrum Disorder. Omega 3. Folic acid.

LISTAS

3NT- 3-nitrotirosina

5-MTHF - 5-metiltetrahidrofolato (do inglês 5-*Methyltetrahydrofolate*)

AGE - Ácido Graxo Essencial

AGP - Ácido Graxo Poliinsaturado

AF - Ácido fólico

ALA - Alfa-Linolênico

AMA - Associação de Amigos Autistas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APA - Associação Americana de Pediatria (do inglês, *American Psychiatric Association*)

APAE - Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais

BNDF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

CA1 - Corno de Amon

CAT - Catalase

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DBCA - Diretriz Brasileira para Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos

DHA - Ácido Docosahexaenóico

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

DG - Dia de Gestação

EPA - Ácido Eicosapentaenóico

EROs - Espécie Reativas de Oxigênio

FCEE - Fundação Catarinense de Educação Especial

GA - Grupo Autista

GABA - Ácido Gama Amino Bútirico

GnA - Grupo não Autista

GPx - Glutationa Peroxidase

IL- 1β - Interleucina 1 beta

IL – 1 - Interleucina 1

IL- 4 - Interleucina 4

IL - 6 - Interleucina 6

IL-17 - Interleucina 17

Ip - Intraperitoneal

LCR - Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

LPS - Lipopolissacarídeo

MDA - Malondialdeído

MIA - Morte Indolor Assistida

NaCl - Cloreto de sódio

NEUROIMET - Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos

OH• - Radical hidroxila

OMS - Organização Mundial de Saúde

PND - Dia Pós-Natal

Poly-IC - *Polyinosinic:polycytidylic acid*

SC - Santa Catarina

SG - Semana Gestacional

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances)*

TCA - Teste do Campo Aberto (do inglês *Open-Field Test*)

TDHA - Transtorno déficit de atenção e hiperatividade

TEA - Transtorno do Espectro Autista

TH4 - Tetrahidrofolato

Th17 - Linfócitos Auxiliares T17 (do Inglês, *Auxiliary lymphocytes T17*)

TLR - receptor Toll-like (do inglês, *Toll-like receptor*)

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral (do Inglês, *Tumor Necrosis Factor*)

TRO - Teste de reconhecimento de objetos

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina

VO - Via oral

ω-3 - Ômega 3

Lista de figuras

Figura 1 – Reação de Fenton..... 27
Figura 2 – Potencial mecanismo do estresse oxidativo no transtorno do espectro autista..... 28
Figura 3 – Desenho experimental da suplementação materna..... 39
Figura 4 – Divisão dos grupos experimentais..... 41
Figura 5 – Síntese das etapas do delineamento do estudo..... 42
Figura 6 – Fases do *grooming*..... 44
Figura 7 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de interação social - parâmetro de cheirar, na prole de animais machos (7A) e fêmeas (7B), em PND45, expostos ao LPS em período pré-natal..... 50
Figura 8 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de interação social – parâmetro permitir a monta, na prole de animais machos (7A) e fêmeas (7B), em PND45, expostos ao LPS em período pré-natal..... 51
Figura 9 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de estereotipia estereotipia – tempo em segundos (8A) e número de episódios (8B) de atividade de *grooming* na prole de animais machos em PND45, expostos ao LPS prenatalmente..... 53
Figura 10 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de estereotipia – tempo em segundos (9A) e número de episódios (9B) de atividade de *grooming* na prole de animais fêmeas em PND45, expostos ao LPS em período pré-natal..... 54
Figura 11 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de memória de habituação – atividade de exploração horizontal (*crossing*) na prole de animais machos (10A) e fêmeas (10B) em PND52, expostos ao LPS em período pré-natal..... 55
Figura 12 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de reconhecimento de objetos, avaliados em

PND52. A memória de curta duração foi considerada 90 minutos após o treino na prole de animais machos (12A) e fêmeas (12B)..... 56
Figura 13 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de reconhecimento de objetos, avaliados em PND52. A memória de longa duração foi considerada 24 horas após o treino na prole de animais machos (13A) e fêmeas (13B)..... 57
Figura 14 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados na medida de dano oxidativo em lipídeos com a concentração de MDA em cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal na prole de animais machos (13A) ou fêmeas (13B), expostos ao LPS em período pré-natal..... 59
Figura 15 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados na medida de dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil em cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal na prole de animais machos (14A) ou fêmeas (14B), expostos ao LPS em período pré-natal..... 61

Lista de quadros

Quadro 1 – Identificação de variáveis..... 48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 NEURODESENVOLVIMENTO 17
1.2 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA 19
1.2.1 Fisiopatologia do autismo 21
1.2.2 Estresse oxidativo 24
1.2.3 Memória 28
1.3 NUTRACÊUTICO 30
1.3.1 Ácido Graxo Polinsaturado Ômega 3 31
1.3.2 Ácido fólico 33
2. OBJETIVOS 36
2.1 OBJETIVO GERAL 36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 36
3. MÉTODOS 37
3.1 TIPO DE ESTUDO 37
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS 37
3.3 ANIMAIS 38
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO 38
3.4.1 Suplementação materna 38
3.4.2 Medidas do peso corporal 39
3.4.3 Acasalamento 40
3.4.4 Indução do modelo animal de TEA 40
3.4.5 Padronização da ninhada 40
3.5 PROTOCOLOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS 43
3.5.1 Teste de Estereotipia 43
3.5.2 Teste de Interação Social 45
3.5.3 Teste de Memória de Habituação 45
3.5.4 Teste de reconhecimento de objetos (TRO) 45
3.6 PROTOCOLOS DE ANÁLISES BIOQUÍMICAS 46
3.6.1 Marcadores de dano oxidativo 46
3.6.2 Normalização das dosagens 47
3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO 47

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS....48
3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA....48
4. RESULTADOS....49
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS....49
4.1.1 Teste de interação social....49
4.1.2 Teste de estereotipia....52
4.1.3 Teste de memória de habituação....54
4.1.4 Teste de memória de reconhecimento de objetos....56
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS....58
4.2.2 Dano aos lipídios....58
4.2.2 Dano às proteínas....60
5. DISCUSSÃO....62
6. CONCLUSÃO....72
REFERÊNCIAS....74
ANEXO....99
ANEXO A - PARECER APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA....99

1. INTRODUÇÃO

No período gestacional o sistema nervoso central (SNC) encontra-se bastante susceptível a alterações morfofuncionais, tanto por fatores genéticos quanto por ambientais, pois seus mecanismos protetores ainda não estão totalmente formados e o feto sofre influência direta da saúde materna[1]. As alterações variam de acordo com período gestacional em que a mãe foi acometida. Dentre as diversas alterações estão as infecções e inflamações que resultam em danos no SNC e representam fatores associados ao desenvolvimento de doenças neurológicas, entre elas o transtorno do espectro autista (TEA)[2].

O TEA é um transtorno neurológico cujas manifestações se desenvolvem no início da infância entre 12 e 24 meses de idade, podendo ser isoladas ou em conjunto, e variando em grau de severidade. As principais características do TEA incluem: deficiências persistentes na comunicação e interação social, padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades[3]. O diagnóstico é baseado na observação clínica dos sinais e sintomas, seguindo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS)[4] e revistos na quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), da Associação Americana de Pediatria (APA)[3].

A fisiopatologia do TEA ainda permanece desconhecida, no entanto, autores sugerem que mudanças estruturais no encéfalo, incluindo córtex pré-frontal, córtex temporal e cerebelo sejam condições comuns em pacientes autistas[5,6]. Dentre as causas do TEA estão os fatores genéticos, os fatores ambientais, ou ainda, uma associação entre ambos[7]. Fatores ambientais como neuroinflamação, presença de estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio (EROs)[8] e infecções pré-natais estão sendo descritas como fatores capazes de alterar os processos iniciais do desenvolvimento do SNC e, consequentemente, desencadear o TEA[9].

Por ser uma doença de etiologia complexa ainda não há tratamento farmacológico específico para os mecanismos moleculares e celulares envolvidos em sua fisiopatologia. A terapia farmacológica baseia-se nos sintomas comportamentais que interferem na vida cotidiana, tais como: ansiedade, transtorno déficit de atenção

e hiperatividade (TDAH), impulsividade e/ou alguma comorbidade neurológica ou psiquiátrica associada[10]. Medicamentos como anticonvulsivantes, antidepressivos e antipsicóticos possuem baixa adesão dos pacientes com comportamento autista devido à demora na resposta terapêutica e efeitos colaterais[11].

Neste sentido, a busca por alternativas não farmacológicas que sejam capazes de atrasar o início ou a progressão dos sintomas do TEA são prementes entre os centros de pesquisa no mundo. A valorização dos alimentos, não somente pelo ponto de vista nutricional, mas como possíveis alternativas capazes de promover o bem-estar, a saúde e redução do risco de doenças, deram origem ao conceito de nutracêutico[12]. Estes são definidos como produtos ou substâncias isoladas administradas a partir de suplementos alimentares que fornecem benefícios fisiológicos para à saúde[13].

Concentrações adequadas de diversos macro e micronutrientes na dieta estão relacionados ao desenvolvimento, funcionamento e maturação dos sistemas neurais[14]. Os principais nutrientes para o desenvolvimento saudável do encéfalo são definidos como aqueles cuja deficiência ocorre em períodos sensíveis ou críticos, como no início da vida e que acabam resultando em alterações a longo prazo[15].

Entre os tratamentos utilizando nutracêuticos que favorecem o crescimento e desenvolvimento do SNC do feto está a suplementação materna de ácido graxo poli-insaturado (AGP) ômega 3 (ω3) e ácido fólico (AF)[16]. Os AGP ω3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA), possuem um importante papel estrutural no desenvolvimento do SNC, apresentando resultados positivos na terapêutica de doenças neurológicas[17] e psiquiátricas[18], agindo como componente restaurador de membranas celulares neuronais[19] e, ainda, como agente antioxidante e anti-inflamatório[20].

O DHA, em especial, é abundante no SNC e na retina, funcionando como um componente estrutural significativo da bicamada lipídica das membranas celulares neurais[21], sendo de grande importância durante o desenvolvimento e maturação do SNC[22]. Estudo demonstrou que a redução nos níveis de DHA está associada ao prejuízo no desempenho cognitivo e comportamental durante o desenvolvimento enefálico[23].

Assim como o AGP ω3, o AF, uma vitamina do complexo B, também desempenha um papel importante durante o desenvolvimento neural. Atua como uma coenzima na via de um carbono importante em vários processos, incluindo a síntese

do ácido desoxirribonucleico (DNA), a proliferação celular e a função imunológica[24,25]. A deficiência de AF durante período gestacional tem sido associada ao aumento do risco de defeitos no tubo neural[24].

Considerando que o TEA está relacionado com alterações no neurodesenvolvimento decorrentes de um processo inflamatório e os efeitos neuroprotetores dos nutracêuticos AGP ω-3 e AF por meio de suplementação, isoladamente ou combinado, quer no período pré-natal ou periconcepcional, podem representar alternativas não farmacológicas associadas à prevenção de condições neuroquímicas e comportamentais, mimetizadas em modelo pré-clínico de TEA a partir da ativação imune materna por lipopolissacarídeo (LPS).

1.1 NEURODESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento SNC humano é um processo longo e demorado. Inicia-se na terceira semana gestacional (SG) pela da diferenciação das células neurais e se estende até o final da adolescência, sendo um dos sistemas mais complexos[26]. No desenvolvimento do encéfalo diferentes estágios estão envolvidos, tais como: neurogênese, migração neural, diferenciação, crescimento axonal, crescimento dendrítico, sinaptogênese, seleção sináptica e apoptose (morte celular programada)[27]. Muitos desses processos ocorrem de forma acelerada na vida fetal e continuam após o nascimento, como o processo de mielinização que aumenta na trigésima semana da gestação e continua ativa até os dois primeiros anos de vida[28].

O processo de neurogênese forma, durante a gestação, mais de 100.000 novas células por minuto[29,30] e tem início no quadragésimo segundo dia gestacional[26]. Inicia-se na oitava SG, aproximadamente, o processo da migração neural, sendo que, na vigésima semana os axônios formam sinapses com a placa cortical, e por volta da vigésima quarta SG os circuitos corticais são organizados[31].

Estima-se que na vigésima oitava SG o encéfalo humano possua bilhões de neurônios, 40% a mais que na idade adulta[32,33]. Essas novas células formadas começam a se comunicar e no terceiro trimestre da gestação a formação de sinapses atinge uma taxa de quarenta mil sinapses por minuto[29].

Estruturas como o hipocampo, local onde se processa a memória de reconhecimento e a memória espacial, inicia seu crescimento na trigésima SG e continua até os dezoito meses de vida. Já o córtex pré-frontal, responsável por

processos mais complexos, como a atenção, atinge seu auge de crescimento nos seis primeiros meses de vida[28,34].

Neurotransmissores como monoamina, estão envolvidos nos sistemas de recompensa, como afeto e humor, tem seu desenvolvimento no período pré-natal e continua em ritmo acelerado até os três primeiros anos de idade[35].

Portanto, o período inicial do desenvolvimento do feto é caracterizado pela plasticidade neural e a sobrevivência depende de sua capacidade em manter a homeostase que é afetada por alterações decorrentes de fatores ambientais[36]. As causas dessas alterações podem estar ligadas as infecções e inflamações[37,38] ou deficiências nutricionais maternas no período gestacional, podendo ter efeitos diferentes sobre o desenvolvimento das regiões cerebrais[15].

Esses processos são baseados no tempo, na dose e na duração desses eventos, resultando em implicações que podem ser irreversíveis a longo prazo[15]. As consequências dos processos infecciosos seguidos de resposta inflamatória podem causar alterações na proliferação, diferenciação neural e na maturação sináptica[39]. Além disso, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças capazes de persistir até a fase adulta[36], incluindo: alterações comportamentais, déficits neurológicos, problemas de aprendizagem, déficits cognitivos[40] e neuropsiquiátricos, como esquizofrenia e TEA[41].

A ativação imunológica no período pré-natal por agentes infecciosos compromete o desenvolvimento neurológico pela alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica, do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e da liberação de glicocorticoides, que modulam diversas funções do SNC, e juntos dão início a um processo de neuroinflamação[39,42]. Estudos pré-clínicos têm utilizado protocolos de ativação imune materna para identificar as doenças do neurodesenvolvimento e os mecanismos celulares a elas associados[42–44]. Dentre eles, o modelo de infecção pré-natal por LPS tem representado uma ferramenta importante para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no TEA[45]. Animais expostos a esta endotoxina estabelecem as três características principais de um modelo animal de doença: a) validade de face (sintomas semelhantes), b) validade de constructo (causa semelhante) e c) validade preditiva (resposta análoga a tratamentos para prevenir ou reverter os sintomas)[46,47].

O LPS é derivado da membrana celular de bactérias gram-negativas, obtido pelo processo de extração fenólica a partir da membrana dessas bactérias, sendo esta

responsável por sua ação antigênica[48]. O LPS e as citocinas não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica em quantidades significativas em condições fisiológicas normais, porém, as citocinas ativadas pelo LPS atuam no SNC ativando receptores próprios[49], como interleucina 1 beta (IL-1β), fator de necrose tumoral (TNF-α) e interleucina 6 (IL-6)[50].

As citocinas liberadas, quando em contato com a micróglia, atuam estimulando a produção de novas citocinas[37,51]. Quando o LPS entra em contato com o organismo, há a ativação do sistema imune liberando citocinas pró-inflamatórias e alguns mediadores químicos que atuam em macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais[52].

Os níveis altos de IL-6 contribuem para o desenvolvimento de linfócitos Th17, produtores de interleucina IL-17 (IL-17). O aumento dos níveis séricos maternos de IL-17A resulta no aumento da expressão de IL-17RA no SNC fetal juntamente com a IL-17 materna, promovendo alterações compatíveis com as manifestações clínicas do TEA[53].

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento, com isso vários estágios do desenvolvimento cerebral são interrompidos. Estudos recentes se concentram em estratégias que conectem diferentes áreas do encéfalo de indivíduos[54].

1.2 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O termo “autista” foi introduzido na literatura psiquiátrica em 1906 por Plouller, mas somente em 1911 que o termo autismo foi utilizado pela primeira vez, pelo médico Eugen Bleuler, psiquiatra suíço. Bleuler descreveu um grupo de crianças com perda do contato com a realidade, prejudicando ou até mesmo impossibilitando sua comunicação[55].

No entanto, foi somente em 1943 que o autismo ficou conhecido pelo psiquiatra infantil Leo Kanner. Kanner foi o primeiro a descrever o autismo como uma condição que se diferenciava das demais conhecidas. Após estudar um grupo de onze crianças entre dois a onze anos, sendo dessas oito meninos, Kanner observou que todas tinham em comum o isolamento, o comportamento obsessivo repetitivo, a resistência a mudança, monotonia e comportamentos incomuns confundidos com debilidade mental e esquizofrenia[56]. Em 1949, Kanner o definiu como Autismo Infantil Precoce, pois por suas observações acreditou que as manifestações tinham início na infância[57].

Um grupo semelhante ao descrito por Kanner foi relatado por Hans Asperger, que descreveu um grupo de crianças com deficiências intelectuais e comportamentais[55], mas com grau mais leve, conhecido como síndrome de Asperger[58]. Foi somente nas décadas de 1950 e 1960, que autismo e a sua etiologia começaram a ser entendidos como uma doença de base biológica[59]. Novas evidências indicavam que o autismo era um transtorno neurológico e não estava relacionado com níveis socioeconômicos, étnicos e raciais ou com aspectos geográficos. A partir disso, os pais das crianças passaram a perceber os sinais do autismo mais precocemente[60].

Em 1980, a terceira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-III), reconheceu o autismo como um transtorno invasivo do desenvolvimento[61]. Atualmente, o autismo é caracterizado como uma doença neurológica com um espectro de apresentações, classificada no DSM-V, atualizado em 2013, como TEA[3].

A prevalência de TEA desde a década de 1960, vem aumentando em todo mundo. Nos Estados Unidos, a frequência em 1998 foi de 1/250[60] crianças, e entre os anos de 2011-2012 a prevalência foi de 1/68 crianças[62]. Os números mais recentes, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*), é de 1 caso para cada 45 crianças[63]. Na Ásia e Europa, a prevalência está entre 1% a 2% de pessoas com o transtorno[64,65].

No Brasil, em 2010, estimava-se cerca de 500 mil pessoas com autismo. Mas, em 2011, um estudo demonstrou a presença de 0,3% de casos de TEA em crianças entre sete e doze anos de idade, equivalente a 27,2/10.000 habitantes[66]. Em Santa Catarina (SC), segundo a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), da Associação de Amigos Autistas (AMA) e a Fundação Catarinense de Educação Especial (FCEE), a prevalência de TEA na população é de 1,31 para cada 10.000 habitantes[67]. O aumento é atribuído as mudanças dos critérios de diagnósticos, melhor habilitação dos profissionais, idade, conscientizações públicas, mudanças políticas e nos serviços públicos[66].

O TEA é mais prevalente no sexo masculino, cerca de quatro vezes mais frequente que no sexo feminino, mas a razão ainda não é muito bem compreendida. Supõe-se que diferenças genéticas e hormonais, durante as primeiras fases do desenvolvimento podem estar implicadas[68]. Uma das hipóteses para alta prevalência no sexo masculino é a exposição a níveis altos de testosterona e estradiol na fase de desenvolvimento, alterando diversos mecanismos do desenvolvimento celular[69].

O TEA é caracterizado por abranger sintomas heterogêneos nas áreas de:

a) Interação social: caracterizado pela ausência de reciprocidade afetiva, pobreza de comportamentos e de formas de comunicação não verbais, como linguagem gestual, contato visual, expressão facial, entre outros.
b) Comportamento e interesses: movimentos repetitivos ou estereotipados, preocupação excessiva com partes ou características não funcionais de objetos ou rotinas e preocupação exclusiva por um tema restrito.
c) Cognição: pobreza do pensamento abstrato de tipo simbólico e imaginativo, além de dificuldades de aprendizagem[70].

Os sintomas do TEA podem ser identificados em crianças a partir dos dezoito meses de idade. A APA sugere realizar o acompanhamento do desenvolvimento de todas as crianças até vinte e quatro meses de idade. Isto porque a partir do segundo ano de vida que os comportamentos mais característicos do TEA tendem a ser mais evidentes[71].

1.2.1 Fisiopatologia do autismo

O TEA é considerado um transtorno multifatorial e seu diagnóstico se concentra nas avaliações comportamentais devido à ausência de marcadores biológicos para identificá-lo[68]. Mesmo com os avanços tecnológicos e de técnicas diagnósticas, a etiologia deste transtorno ainda não foi totalmente elucidada, principalmente, por causa da heterogeneidade dos seus sintomas. Todavia, é consenso entre os pesquisadores que ocorre uma combinação entre fatores genéticos e ambientais[71].

As causas genéticas do TEA representam cerca de 25% dos casos[72] e que em torno de 200 a 1.000 genes estão envolvidos[73]. Embora haja uma forte base genética, outros fatores estão relacionados, como fatores ambientais pré-natais, perinatais e pós-natais, que contribuem para a etiologia multifatorial do TEA[74]. Dentre os fatores ambientais, destacam-se a infecção materna, a exposição ao estresse oxidativo[75] com a disfunção mitocondrial[76] e doenças autoimunes[77]. Estudos indicam que nascidos de mães com doença autoimune, como artrite reumatoide e diabetes, são 49-64% mais susceptíveis a desenvolver TEA[78,79].

A relação entre doenças autoimunes maternas e risco ao TEA, possivelmente está relacionada aos efeitos dos mediadores inflamatórios e dos anticorpos maternos

que agem durante o período do desenvolvimento neurológico do feto[8,80]. As alterações no sistema imunológico são uma das hipóteses mais estudadas na etiologia do TEA[81]. Neste transtorno, a atividade imunológica está comprometida tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo, afetando o desenvolvimento neurológico. Encontrando-se níveis elevados de citocinas em diferentes áreas no tecido cerebral, no líquor, na circulação sanguínea e no sistema digestório, alterando a proliferação e a sobrevivência neuronal[82].

O estudo realizado por Krakowiak e colaboradores[83], avaliou o papel das citocinas na gravidade do TEA. Os níveis de 17 citocinas e quimiocinas foram mensurados entre 214 crianças diagnosticadas em diferentes graus de autismo. Os resultados demonstraram que níveis altos de IL-4 e IL-1β variaram dependendo da gravidade do transtorno[83]. Com esses achados, sugere-se que as reações neuroimunes fazem parte do processo neuropatológico do TEA e que as respostas imunes podem contribuir para a disfunção no SNC. Contudo esses achados requerem mais evidências que comprovem esta hipótese[82].

A idade avançada dos pais (ambos, mãe e pai), também contribui para um aumento do risco de desenvolvimento do TEA, em torno de 18 e 21%[84]. Mães obesas ou com excesso de peso aumentaram o risco em cerca de 28% a 36%[85], pois a obesidade materna modifica a expressão de genes que são importantes para o desenvolvimento neurológico no período intrauterino[86]. Outros fatores, como ambiente uterino menos favorável, maior risco de complicações obstétricas e mutações genéticas, têm sido atribuídos ao transtorno, principalmente os que ocorrem no início do neurodesenvolvimento[87].

Além disso, outros fatores podem estar relacionados, como a resposta a insultos ambientais, a ativação imunológica materna, causando o estresse pré-natal e afetando severamente o sexo masculino devido a um genótipo vulnerável[68]. Do mesmo modo, há um maior risco de recorrência para uma criança com um irmão mais velho que tenha sido diagnosticado com TEA, entre 3% e 18,7%[88].

No início do desenvolvimento do SNC, ocorre uma grande formação de sinapses seguidas de seletiva eliminação das mesmas. A regulação das sinapses ao longo da vida pós-natal é importante para adequada maturação cerebral. No TEA um número aumentado de neurônios está prejudicado, alterando o processo dos circuitos neurais, como a remoção de neurônios desnecessários e sem funcionalidade, e o aumento de neurônios operacionais[89].

Estudos de neuroimagem apontam anormalidades em diferentes regiões encefálicas a partir do primeiro ano de vida, incluindo alterações no córtex cerebral, amígdalas e hipocampo[90], além do aumento no perímetro encefálico[91]. Um estudo de neuroimagem conduzido por Hazlett e colaboradores[92], analisou 148 crianças de seis, doze e vinte e quatro meses de vida, com risco familiar de TEA. Este estudo revelou uma hiperexpansão da área cortical entre os seis e doze meses de vida em crianças que aos vinte e quatro meses receberam o diagnóstico do TEA, demonstrando que as alterações cerebrais ocorrem antes dos sintomas comportamentais. Outro estudo utilizando ressonância magnética avaliou o volume cerebral de 63 crianças do sexo masculino, sendo 45 diagnosticadas com TEA, com e sem agressividade associada. Os dados revelaram que menor volume do tronco encefálico foi associado a maior probabilidade de agressão, uma das comorbidades comportamentais associadas ao TEA[93].

Suspeita-se que neurotransmissores como o glutamato e o ácido gama amino butírico (GABA), principais neurotransmissores inibitórios na vida adulta responsáveis por regular o sono, a aprendizagem, memória e cognição, estejam envolvidos na fisiopatologia do TEA[6]. Outro neurotransmissor envolvido é a serotonina, visto que, cerca de 30% dos indivíduos com TEA apresentam altos níveis de serotonina no sangue. Além de ser um neurotransmissor, a serotonina atua modulando as respostas imunes[94].

Também são evidentes a maior ativação microglial (principal célula imune do SNC)[95] e a diminuição do número e do comprimento dos processos astrocíticos[96]. A micróglia e os astrócitos são capazes de produzir citocinas pró e anti-inflamatórias, e são considerados células imunocompetentes fundamentais no desenvolvimento do SNC. Estas acompanham as mudanças ao longo do desenvolvimento, como memória e a aprendizagem, e estão associadas a transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade[97,98].

A atividade do encéfalo de crianças com TEA apresenta conectividade funcional diminuída no que diz respeito à linguagem, memória, mecanismos de resolução de problemas e processamento social. A conectividade neural diminuída e a sinaptogenêse prejudicada são importantes na patogênese do TEA[99].

Foram observados em alguns tecidos retirados *postmortem* de pacientes com TEA, processos neuroinflamatórios no córtex e na substância branca por ativação neuroglial e astroglial, confirmando o papel do sistema imune em tecidos cerebrais[100].

Fatores como exposição materna a mudanças no ambiente e a susceptibilidade genética podem estar envolvidos nas reações neurogliais. Portanto, distúrbios imunológicos não apenas fazem parte do transtorno, mas contribuem para a etiologia da doença[89].

Além disso, algumas disfunções neurais nos indivíduos com TEA ocorrem pelas alterações na micróglia e na astroglia, envolvidas na organização cortical, conexões neuroaxonal e na plasticidade sináptica. Essas alterações podem ser medidas pelas EROs, as citocinas, quimiocinas, entre outras substâncias[89].

Dentre os fatores ambientais que predispõe o desenvolvimento do TEA, o processo inflamatório pré-natal induzindo o aumento do estresse oxidativo e gerando um processo inflamatório no SNC, que pode estar relacionado a sua fisiopatologia[101].

1.2.2 Estresse oxidativo

Formados nos processos fisiológicos normais ou patogênicos, os radicais livres são definidos como átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados, conferindo alta reatividade[102]. Quando são considerados prejudiciais, o elétron não emparelhado reage com outros íons e/ou moléculas para ligar-se a um elétron desta outra molécula, com objetivo de emparelhar-se. Este efeito produz perturbações e, consequentemente, danos às células[103].

Os metabólitos derivados deste processo, considerados em conjunto, são denominadas EROs. As EROs, responsáveis pelas reações oxidativas, são geradas como subproduto do metabolismo aeróbico normal, através de fontes endógenas como a mitocôndria, inflamações e isquemia, e por fontes exógenas como poluentes, radiação e fumaça de cigarro[104].

Quando ocorre uma sobrecarga de EROs, sua acumulação gera uma condição chamada de estresse oxidativo[103], definido como o desequilíbrio entre as EROs e a capacidade do organismo em neutralizar a sua ação pela proteção antioxidante[105]. O organismo possui diversas formas de combater o estresse oxidativo e os danos causados pelas EROs, conferindo proteção com enzimas e moléculas antioxidantes[106].

O sistema antioxidante intracelular enzimático inclui as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx)[107]. O sistema de

defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética[107–109], entre os quais se destacam as vitaminas, minerais e compostos fenólicos[110].

As enzimas CAT e GPx agem impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e HaberWeiss, com a participação dos metais ferro e cobre, geram o radical hidroxila (OH•), o qual não há sistema enzimático de defesa[107,111]. O radical OH• tem grande potencial reativo e grande instabilidade. Essas características o tornam o radical livre mais propício na produção de danos oxidativos[112]. Além disso, inicia o processo de peroxidação lipídica, com alterações nas funções biológicas das membranas celulares, age sobre as proteínas, alterando suas estruturas e funções, e ataca o DNA possibilitando a ocorrência de mutações[112]. O processo de peroxidação lipídica é complexo e envolve a interação de EROs com os ácidos graxos poli-insaturados, resultando em uma variedade de aldeídos eletrofílicos altamente reativos[113]. O SNC é um dos principais alvos do processo da peroxidação lipídica, pois contém altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados e esses lipídios são vulneráveis ao processo de oxidação[113]. Além disso, o SNC possui níveis diminuídos da enzima antioxidante CAT, sendo mais exposto aos danos provocados pelas EROs[114].

Com isso, a peroxidação lipídica é um dos principais causadores de lesão, pois afeta diretamente as membranas neuronais e gera vários subprodutos secundários como o malondialdeído (MDA), acarretando em dano celular[115]. Estes compostos secundários são utilizados como marcadores de peroxidação lipídica e foram verificados em muitas doenças[116].

Outro alvo das EROs e modificação oxidativa são as proteínas. Esse processo de oxidação resulta na formação de carbonilas, tióis oxidados, entre outras modificações que alteram a função normal da proteína[117], como perda de estrutura ou atividade enzimática[118]. A formação da proteína carbonilada é um fenômeno comum durante a oxidação, portanto, sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo[117], pois é um marcador estável de oxidação proteica. A acumulação de proteína carbonilada tem sido observada em diversas doenças, como Alzheimer e diabetes[119]. Os níveis elevados de carbonilação proteica são indicadores não somente de estresse oxidativo, mas também de doenças relacionadas ao metabolismo proteico[120].

A SOD é a primeira linha de defesa frente as EROs, é uma enzima abundante do organismo[121] e está presente em todos os organismos aeróbios. Tem a função de catalisar a dismutação de oxigênio em oxigênio e peróxido de hidrogênio[122]. Esta reação ocorre espontaneamente em pH fisiológico, porém com a presença de SOD, a velocidade da reação é 104 vezes maior[123]. A SOD pode ser encontrada sob duas formas: uma delas no citoplasma, onde é dependente de cobre e zinco, e outra na mitocôndria, onde necessita do manganês como cofator[111,124].

Com a presença de uma infecção o encéfalo prepara uma resposta inflamatória baseada na ativação microglial, invasão local de células imunológicas circulantes e produção de EROs[125]. A catalase atua na sequência da SOD, catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio à oxigênio e água[126,127]. Pode ser encontrada em maiores concentrações no fígado, rins e eritrócitos, também apresenta atividade no SNC[128].

A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria[111,124]. A GPx mitocondrial representa 60% da taxa de redução do peróxido de hidrogênio. A deficiência de GPx conduz a danos celulares com disfunção mitocondrial[129]. Estas enzimas antioxidantes são necessárias nos primeiros momentos de desenvolvimento do sistema nervoso para a sobrevivência neuronal[130].

O SNC é mais vulnerável ao estresse oxidativo devido à alta demanda de energia do encéfalo[131], maior quantidade de lipídeos e ferro, e uma menor concentração de enzimas antioxidantes[115]. Além disso, as crianças são mais vulneráveis que os adultos ao estresse oxidativo por terem níveis baixos de antioxidantes desde sua concepção até a infância[130]. O risco obtido por este déficit natural na capacidade antioxidante em lactantes é aumentado por fatores ambientais que levam ao estresse oxidativo, encontrando-se mais elevados que nas suas mães e acumulando-se na placenta[132].

Esses fatores somados tornam o estresse oxidativo induzido por EROs como um dos principais fatores associados à fisiologia de muitas doenças neuropsiquiátricas, sugerindo desempenhar papel-chave no desencadeamento do TEA[133]. As áreas encefálicas afetadas em indivíduos diagnosticados com TEA, apresentaram morte celular acelerada causada por este processo[134]. Regiões encefálicas como o córtex orbitofrontal, a área de Wernicke e o hemisfério cerebelar, possuem altos níveis de marcador de estresse oxidativo 3-nitrotirosina (3-NT) em

indivíduos diagnosticados com TEA, áreas associadas com o processamento da fala, comportamento emocional, social e memória[101].

Chauhan e colaboradores[135], encontraram no plasma de crianças autistas um aumento na peroxidação lipídica quando comparadas aos irmãos não-autistas. O MDA é o produto final da peroxidação lipídica, sendo utilizado como um marcador de estresse oxidativo. Níveis elevados foram relatados em indivíduos com TEA, quando verificado por reação ao ácido tiobarbitúrico[132]. Do mesmo modo, em crianças com comportamento autista foram relatadas a diminuição de enzimas antioxidantes, como a SOD e a GPx[136,137].

Níveis diminuídos das proteínas antioxidantes ceruloplasmina e transferrina têm sido atribuídos ao TEA, juntamente com aumento da peroxidação lipídica[138]. A ceruloplasmina (proteína que transporta cobre) e a transferrina (proteína que transporta ferro) são sintetizadas em vários tecidos, incluindo o encéfalo[135,139,140]. A peroxidação lipídica é inibida pela ceruloplasmina pela catalisação de íons metálicos como ferro e cobre[141], protegendo as membranas das células vermelhas do sangue, atuando como ferroxidase e superóxido dismutase[140].

A transferrina atua como um antioxidante na redução da concentração de íons de ferro livre[139], que contribuem para o estresse oxidativo, catalisando a conversão de peróxido de hidrogênio para radicais de hidroxila que são altamente tóxicos pela reação de Fenton (Figura 1)[142]. Os níveis dessas proteínas estão correlacionados a perda de competências linguísticas e cognitivas, como a memória, em crianças autistas[132].

$$Fe^{3+} + \bullet O^{2-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2^{\bullet}$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$$

Figura 1 - Reação de Fenton.

Fonte: Mirończuk-Chodakowska e colaboradores[143].

Com isso, o estresse oxidativo no TEA pode ser causado pelo desequilíbrio entre a geração de EROs por fatores endógenos/exógenos pró-oxidantes e o mecanismo de defesa contra EROs por antioxidantes (Figura 2)[132].

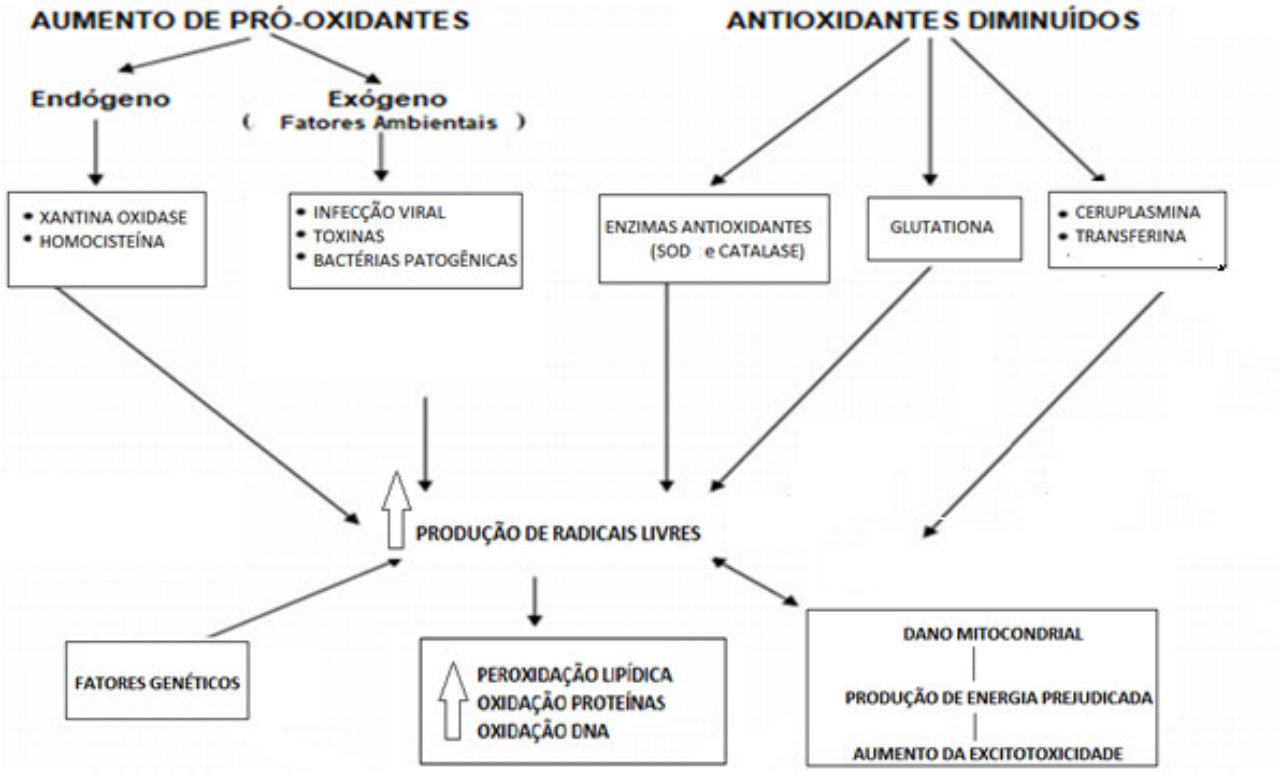

Figura 2 - Potencial mecanismo do estresse oxidativo no transtorno do espectro autista.

Fonte: Chauhan[132].

Esses dados reforçam a hipótese da importância do estresse oxidativo no prejuízo das funções executivas como a memória na fisiopatologia do TEA[144].

1.2.3 Memória

A memória envolve processos ligados a fatores neurofisiológicos, neuroquímicos e comportamentais que representam propriedades fundamentais do SNC[145]. Neste sentido, não pode ser definida apenas como uma recordação ou lembrança de um evento determinado. O processo de formação de memórias envolve quatro etapas: aquisição, formação, conservação e evocação de informações[146].

O SNC forma e retém apenas as memórias que considera relevantes, não existindo uma única localização, ela ocorre de forma distribuída[147]. Porém, as estruturas que regulam a evocação, gravação e sua formação incluem o hipocampo, o córtex entorrinal e parietal, o giro cingulado, amígdala e o tálamo. Este conjunto de estruturas constituem um sistema modulador do que deve ou pode ser evocado e

gravado[147]. Com isso, o hipocampo e a amígdala recebem essas informações dos sistemas sensoriais provenientes do córtex, projetam ao hipotálamo e através destes ao tálamo e ao córtex[148].

Já de acordo com seu conteúdo, as memórias podem ser divididas em memórias explícitas ou declarativas, e memórias implícitas ou não declarativas[146]. As memórias explícitas ou declarativas são aquelas que podem ser evocadas conscientemente, depende da atividade neuronal do hipocampo e estruturas relacionadas ao lobo temporal, são subdividas em episódica e semântica[149]. As episódicas permitem evocar detalhes sobre eventos ocorridos no passado passiva ou ativamente[150]. A memória semântica se refere à conhecimentos em geral[151]. As implícitas são as que influenciam o comportamento do indivíduo, sem que ele se dê conta de que aprendeu[152]. Algumas memórias implícitas e não-declarativas são chamadas de memórias de procedimento, estão relacionadas as habilidades motoras, como andar de bicicleta e nadar[152].

De acordo com sua duração as memórias são classificadas em: memória de trabalho, memórias de curta duração e de longa duração[144]. A memória de trabalho é processada principalmente pelo córtex pré-frontal e determina o contexto em que os diversos fatos, acontecimentos ou informação ocorrem[153]. É importante para realizações de tarefas do dia a dia, para resolução de problemas e gerenciamento do comportamento[153].

As memórias de curta duração armazenam poucas informações por um período de 3 a 6 horas, podendo ou não ser armazenadas como memória mais estável e permanente[154,155]. As memórias de curta duração são formadas continuamente, são usadas para lembrarmos sobre fatos ocorridos há poucas horas e para ser convertida em longo prazo esta deve ser consolidada[154,155]. Todo o processo é desenvolvido no hipocampo e no córtex entorrinal, utilizando mecanismos próprios e independentes das memórias de longa duração[154,155].

As memórias de longa duração referem-se aquelas armazenadas durante longo período e de um modo mais permanente. Podem durar dias, meses ou anos. Esse processo de fixação é chamado consolidação, sua formação envolve a ocorrência de eventos bioquímicos na região CA1 (Corno de Amon) do hipocampo dorsal e em suas projeções originando novas conexões sinápticas[155,156]. As memórias de longa duração podem estar sujeitas ao esquecimento e a extinção da informação, assim como podem sofrer uma falsificação ou melhora da mesma[156].

Dentre as diversas manifestações clínicas do TEA, estudos recentes relatam prejuízo na memória, envolvendo os componentes da inibição, do planejamento, da flexibilidade mental, da fluência verbal e sobretudo na memória de trabalho[157]. Os déficits de memória no TEA podem explicar alguns dos sintomas clínicos como a incapacidade de codificar a informação, podendo contribuir para a disfunção nos domínios social, de comunicação e de raciocínio[158]. Em indivíduos com TEA, os déficits na função executiva podem estar relacionados a alterações no córtex pré-frontal[159].

Considerando que o TEA apresenta prejuízo nas funções executivas como a memória, a suplementação com alguns nutracêuticos, como o AGP ω-3 e AF, podem representar uma alternativa terapêutica para a melhoria dos sintomas clínicos. Pois, o DHA se acumula em áreas do encéfalo associadas a aprendizagem e a memória, e a sua diminuição está associada a transtornos neurológicos e psiquiátricos como esquizofrenia e TEA[160]. Além disso, o AF tem um papel importante no desenvolvimento do SNC e a suplementação deste tem sido relacionada a melhora da memória de curto e longo prazo em doenças neurológicas[161].

A busca por essas alternativas terapêuticas que visem a recuperação e/ou proteção de mecanismos que envolvam os processos de aquisição, consolidação e evocação das memórias são importantes para melhorar a qualidade de vida de indivíduos com TEA.

1.3 NUTRACÊUTICO

O papel dos alimentos nos últimos anos não se volta apenas ao seu valor nutricional, mas aos potenciais benefícios à saúde. Isso levou a comercialização de vários substâncias extraídas dos alimentos, gerando uma nova categoria de compostos: os nutracêuticos[162]. O termo nutracêutico é derivado de nutrição e farmacêutica, surgiu em 1989 pelo médico pesquisador Stephen DeFelice fundador da *Foundation for Innovation in Medicine*[163].

São definidos como nutracêuticos produtos ou substâncias isoladas a partir de suplementos alimentares, alimentos e fitoterápicos, que fornecem benefícios fisiológicos para saúde, seja na prevenção ou no tratamento de doenças pela suplementação de vitaminas e minerais ou na melhora da saúde[13]. São encontrados de diversas formas, como comprimidos, cápsulas, vitaminas e compostos bioativos[163].

Muitos dos fármacos disponíveis para o tratamento de doenças, como o TEA, estão voltados aos sintomas e para as comorbidades associadas, e não aos mecanismos celulares e moleculares relacionados a sua fisiopatologia[10]. A baixa adesão dos pacientes autistas a terapias farmacológicas disponíveis se deve aos efeitos colaterais e a demora da resposta terapêutica devido a hetereogeniedade dos sintomas[11]. Com isso, a busca por alternativas não farmacológicas capazes de atrasar ou minimizar os sintomas, fez com que os nutracêuticos ganhassem um papel cada vez mais relevante na terapêutica de transtornos neurológicos como o TEA[164].

A classificação dos nutracêuticos se dá de acordo com seu mecanismo de ação, sua natureza química ou sua fonte alimentar[165]. Entre as principais classes de nutracêuticos estão os lipídios, as vitaminas, os minerais, os aminoácidos, as vitaminas antioxidantes e os ácidos poli-insaturados[13]. Estes são capazes de atuar oferecendo benefícios fisiológicos ou fornecendo proteção contra doenças[166].

Devido ao potencial nutricional, à segurança e aos efeitos terapêuticos, os nutracêuticos estão sendo usados como uma alternativa aos compostos sintéticos para a prevenção e tratamento de doenças neurológicas, melhorando o funcionamento do sistema nervoso, aumentando a liberação de neurotransmissores, preservando a memória e a capacidade cognitiva[167].

Vitaminas do complexo B, como o AF e AGP ω-3 são dois nutracêuticos amplamente estudados no desenvolvimento e proteção do SNC[19]. A deficiência do AF e AGP ω-3 pode prejudicar a função cerebral e aumentar o risco de distúrbios neurológicos e de desenvolvimento[168].

Um estudo realizado por Schmidt e colaboradores[169], revelou que as mulheres que usaram suplementos vitamínicos durante o período periconcepcional tiveram um menor risco de filhos desenvolverem distúrbios neurológicos e de desenvolvimento. Portanto, o uso de nutracêuticos pode representar uma alternativa na prevenção de doenças neurológicas como o TEA.

1.3.1 Ácido Graxo Polinsaturado Ômega 3

Os ácidos graxos essenciais (AGE) não são sintetizados endogenamente, mas são importantes para o desenvolvimento e funcionamento normal do SNC e do sistema imunológico, modulando respostas inflamatórias[2]. Dois dos mais importantes AGP ω-3 são o EPA e o DHA[170]. Os tecidos que têm a capacidade de biossintetizar

EPA e DHA são o fígado, as gônadas e em menor escala, os tecidos nervoso e adiposo, fazendo-os a partir do precursor ácido α-linolênico (ALA), por de sistemas enzimáticos de alongamento e dessaturação[170,171].

É possível encontrar o AGP ω-3 na forma de ALA, em fontes de origem vegetal, como óleos extraídos de soja, milho, girassol, linhaça e alguns vegetais verdes como brócolis, rúcula e espinafre[172]. O ALA é pouco convertido na maioria dos seres humanos devido a influência de fatores como consumo de álcool, diabetes e envelhecimento, não sendo uma fonte importante de AGP ω-3[173,174].

Em algumas espécies de peixes como sardinha, truta e salmão é possível encontrar AGP ω-3 na forma de DHA e EPA[175,176]. Eles agem diretamente na membrana celular[166], importantes para a estrutura e função encefálica, e são usados para tratamento de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, como o TDHA[177] e TEA[178].

Além disso, o AGP ω-3 possui um papel importante em processos inflamatórios[179]. A redução na dieta de AGP ω-3 durante a gestação e lactação de ratos, foi capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1β e IL-6, aos 21 dias de vida da prole e alterando a expressão de genes que estão relacionados a plasticidade neural[179].

O DHA, em especial, atua em nível celular modulando a relação entre astrócitos e neurônios nos sistemas de neurotransmissão, como dopaminérgico, serotonérgico e colinérgico[180,181]. Auxilia na comunicação intercelular em membranas astrócitárias[182], participa na diferenciação morfológica de astrócitos e neurônios, promovendo a sinaptogênese[183,184], e atua na neurogênese e na migração neuronal[185]. Tem sido relatado que a suplementação de DHA melhora a memória episódica, bem como, a memória semântica e de trabalho, sugerindo que níveis adequados de DHA desempenham um papel importante na função cognitiva e aprendizagem[23,186]. Lozada e Colaboradores[187], conduziram um estudo onde os ratos fêmeas foram suplementadas no período gestacional com uma dieta pobre em AGP ω-3 e constataram que o DHA foi reduzido em cerca de 50% no cérebro da sua prole, avaliados na 3ª semana de idade, acarretando em impacto duradouro sobre a função cognitiva dos mesmos.

O DHA é capaz de prevenir a redução de neurônios dopaminérgicos da substância negra em um modelo de doença de Parkinson, reduzindo a produção de EROs e aumentando a expressão do fator de transcrição Nrf2, que atua regulando a expressão de proteínas antioxidantes[188]. Um estudo realizado por Hashimoto e

colaboradores[189], com suplementação de DHA na dieta de ratos, concluiu que houve melhora na aprendizagem e diminuição dos níveis de peroxidação lipídica e EROs no hipocampo desses animais. Além disso, o EPA foi capaz de atenuar a perda de memória espacial e protegeu as células do hipocampo em camundongos idosos, reduzindo o estresse oxidativo dentro das células, resultado semelhante ao do DHA[190].

Estudos apontam dano oxidativo e processo inflamatório associados a transtornos do neurodesenvolvimento, incluindo TEA, e deficiências ou desequilíbrios de AGP ω-3 podem estar relacionadas as manifestações clínicas apresentadas por pacientes autistas[191,192]. Um estudo realizado por Fortunato e colaboradores[193], com suplementação na prole de AGP ω-3 em animais expostos ao LPS reverteu comportamentos semelhantes aos que ocorrem no TEA e em outros distúrbios mentais.

Durante a gestação e lactação a suplementação materna de AGP ω-3 pode ser importante devido aos efeitos benéficos do AGP ω-3, principalmente pela absorção fetal via placentária ou suplementação de aporte. A ingestão adequada durante os períodos gestacional e pós-natal pode trazer benefícios para a acuidade visual e do SNC do recém-nascido[194]. Neste período de maior crescimento do encéfalo, que compreende o último terço da vida fetal e os dois primeiros anos de vida, o DHA é essencial para o desenvolvimento dos sistemas neurais, pois apresenta a maior fluidificação em membranas celulares[178,195]. Além disso, a deficiência perinatal de AGP ω-3 está relacionada a alterações na resposta inflamatória neuronal levando ao desenvolvimento de uma condição pró-inflamatória no SNC, que contribui para alterações no neurodesenvolvimento[196].

1.3.2 Ácido fólico

O AF é uma vitamina do complexo B, também conhecida como folato, que atua como uma coenzima no metabolismo de compostos do carbono[197]. É uma vitamina hidrossolúvel e encontrada de duas formas: natural e sintética[16]. Na forma natural é encontrado em vegetais folhosos verdes escuros, feijão e grãos integrais, e na sua forma sintética é utilizado como suplementação e na fortificação de alimentos[198], como farinhas. Na forma sintética é altamente absorvido, enquanto na forma natural obtido pela dieta é absorvido em menor grau[198].

A forma ativa do AF é o tetrahidrofolato (TH4) (adição de grupos metilas ao AF através da enzima dihidrofolato redutase), essa reação de adição de mais unidades de carbono produz a forma monoglutamil 5-metiltetrahidrofolato (ácido folínico)[197], sendo a forma mais estável, encontrada na circulação e nos tecidos, e está envolvida no metabolismo e funcionamento de muitas substâncias que são essenciais para a função do sistema nervoso[199,200].

Nas primeiras semanas de gestação, a necessidade de AF aumenta devido à rápida divisão celular embrionária, sendo importante para diversas funções no organismo, como a participação da biossíntese de nucleotídeos, remetila a homocisteína, e atua prevenindo os defeitos no tubo neural durante o desenvolvimento do SNC[201].

Além da importância no crescimento e desenvolvimento do feto, contribui também para formação de novas células e tecidos[202]. Além disso, exerce papel neuroprotetor em danos ao SNC, por promover reparo e crescimento neuronal[203], contribuindo na proliferação e crescimento de células da glia e neuronais, na síntese de neurotransmissores, na neuroplasticidade e na manutenção da integridade neuronal[204,205].

O AF possui um papel protetor contra a citotoxicidade induzida por glutamato, protegendo os neurônios do dano induzido pelo peptídeo β-amiloide mantendo a função mitocondrial, a integridade de DNA e a regulação de genes associados à apoptose[205]. Apresenta também propriedades antioxidantes, uma vez que pode ser considerado um agente modulador de ferro (Fe^{2+})[206], e agir eliminando EROs e inibindo a peroxidação lipídica[207]. Além de apresentar propriedades antioxidantes[208], o AF atua reduzindo os níveis de vários mediadores inflamatórios[209].

A quantidade de folato absorvido e biodisponibilizado pelo organismo pode ser influenciada pela má absorção em condições patológicas na gestação e lactação[210]. A deficiência de AF em mulheres na idade reprodutiva pode levar a defeitos de fechamento do tubo neural e comprometimento das funções neurológicas, para a prevenção é fundamental o uso da suplementação desde o período periconcepcional[211].

Baixas concentrações de folato durante a gravidez estão associadas a um maior risco de problemas comportamentais, menor função cognitiva e menor fluência verbal em crianças[212]. Além do aumento do risco de desenvolvimento de doenças psiquiátricas, cognitivas e neurológicas, como o TEA[213]. Contudo, os mecanismos de

prevenção ainda não estão totalmente elucidados[214]. Um estudo concluiu que a deficiência de AF pode ser associada com determinado polimorfismo no gene metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR), aumentando o risco de TEA[215]. Além disso, o AF é importante no metabolismo de um carbono que está envolvido no mecanismo de metilação e nas atividades dos genes, neurotransmissores e proteínas[216]. A função do ciclo de um carbono é regular os níveis de fosfolipídios das membranas como o DHA neuronal através da transferência dos grupos metil[217,218].

Crianças com TEA tem este mecanismo de metilação prejudicado[219,220]. A suplementação no período periconcepcional tem sido associada ao aumento da capacidade de metilação dos genes[221], importante no período inicial do desenvolvimento para o desenvolvimento cerebral a longo prazo[222].

O AF também participa da síntese de dopamina, norepinefrina e serotonina[176,223]. Possuiu importante papel na formação de metionina através da remetilação da homocisteína. Suas principais vias metabólicas ocorrem no fígado e nos rins[223]. A homocisteína é um importante aminoácido biomarcador nas possíveis deficiências de vitaminas como vitamina B6, B12 e AF[224]. Em autistas, foram encontradas altas concentrações de homocisteína na urina podendo indicar deficiência de AF e vitaminas do complexo B[224]. Também foram encontradas menores concentrações de folato no líquido cefalorraquidiano (LCR), que tem sido relacionado com atrasos no desenvolvimento relacionados ao TEA[225].

Dada a importância dos ácidos graxos e do AF no desenvolvimento do SNC e da relação entre a ingestão materna e disponibilidade para o feto em desenvolvimento, o aumento da suplementação de AGP ω-3 materna na gestação e lactação destes compostos, de forma isolada ou associada, pode representar uma alternativa terapêutica para a melhoria dos sintomas de TEA[180].

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração de AGP ω-3 e de AF, isolados ou em combinação, sobre a neuroproteção de ratos submetidos à um modelo experimental de TEA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar os efeitos do AGP ω-3 e AF, isolados ou em combinação, sobre os seguintes parâmetros comportamentais:
   - interação social (45 dias de vida);
   - estereotipia (45 dias de vida);
   - memória de habituação (52 dias de vida);
   - memória de reconhecimento (52 dias de vida).

b) Avaliar os efeitos do AGP ω-3 e AF, isolados ou associados, sobre os seguintes parâmetros bioquímicos:
   - dano oxidativo em lipídios, no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo;
   - dano oxidativo em proteínas, no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

É um estudo experimental utilizando modelo animal de autismo induzido por LPS via intraperitoneal (ip) em fêmeas prenhes aos 9,5 dias gestacionais.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos (NEUROimet) da Universiade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Tubarão/SC. Os seguintes equipamentos foram utilizados:

Agitador magnético (752A, Fisatom).
Balança analítica (M214A, BEL engeening).
Banho-maria (DeLeo equipamentos laboratoriais).
Espectrofotômetro (NOVA1103, Novainstruments).
Espectrofotômetro (U2010, Hitachi).
Estufa de secagem (DeLeo).
Freezer (F21, Eletrolux).
Homogeneizador potter (Marconi).
Leitor de microplaca (TP reader, Thermo Plate).
Medidor de pH (pHB500, ION).
Microcentrífuga refrigerada (NT805, Novatecnica).
Osmose reversa (RO/0520, Permution).
Refrigerador (R270, Eletrolux).
Vortex (Biomixer).
LPS obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (*Sigma-Aldrich®*).
Aparato de campo aberto (caixa de 60 x 60 x 30 cm).
Webcam 2.0 megapixels, tripé e notebook.
AGP ω-3 solução líquida (Essential Nutrion).
AF solução líquida (Essential Nutrition).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizadas 18 fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas (45 dias), virgens, pesando entre 250 e 300g, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, sendo acasaladas com nove machos da mesma linhagem (duas fêmeas para cada macho) e peso. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em padrão sanitário controlado, onde foram mantidos em gaiolas de polipropileno 46x31x21cm, forradas com cama de maravalha. Os animais ficaram em temperatura controlada (22ºC +/- 1) e períodos de luz artificial (12 horas claro/escuro), recebendo ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água *ad libitum*.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

3.4.1 Suplementação materna

O período de suplementação compreendeu uma fase de adaptação de 15 dias antes do acasalamento e estendeu-se durante as fases de gestação e lactação até os 21 dias de vida dos filhotes[226]. Os animais foram alocados em quatro grupos como segue abaixo:

1) Grupo controle (n: 3): ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água *ad libitum.*
2) Grupo AGP ω-3 (n: 5): Uma dose diária de 0,8 g/kg dia via oral (VO)[227].
3) Grupo AF (n: 5): Uma dose diária de 3,0 mg/kg/ dia VO[228].
4) Grupo AF + AGP ω-3 (n: 5): Uma dose diária de 0,8 g/kg VO, mais uma dose diária de 3,0 mg/kg/ dia VO de AF.

A síntese da suplementação materna está descrita na Figura 3.

Figura 3 - Desenho experimental da suplementação materna. O experimento iniciou-se em dia (D) 45 os animais foram pesados, para início do tratamento foi administrado VO (gavagem) por 15 dias (fase de adaptação) até D 60, em D 60 até DG 0 fase de acasalamento não houve a suplementação evitando efeitos estressores. A partir de DG 0 as fêmeas foram pesadas e iniciou-se o tratamento, foi administrado por via oral (gavagem) por 21 dias consecutivos, entendendo-se até final do período de lactação de DG 21 ao PND 21. Em PND 21, passaram pelo desmame e receberam água e ração *ad libitum*. Em PND 45, 52 e 59 foram realizados os testes comportamentais. Abreviaturas: D = dia; DG = dia gestacional; PND = dia pós-natal.

Os animais receberam suplementação de AGP ω-3 e AF, de acordo com o grupo experimental, a partir de D 45 ao D 60, fase de adaptação (15 dias consecutivos) uma vez ao dia, administrado no mesmo horário e por VO. Na fase do acasalamento D60 ao DG0, os animais não foram suplementados evitando efeitos estressores que acabassem prejudicando o acasalamento, a partir do DG 0 os animais iniciaram a suplementação por 21 dias consecutivos (fase gestacional) e estendendo-se até ao final do período de lactação DG 21 ao PND 21 por 21 dias consecutivos uma vez ao dia, administrado no mesmo horário e por VO, conforme grupo experimental.

A escolha da dose de AGP ω-3 (0,8 g/kg) foi baseada em estudo de Zugno e colaboradores[227] e de Fortunato e colaboradores[193]. A dose de AF de 3 mg/kg/dia foi baseada nos estudos de Firat e colaboradores[228] e Bienengräber e colaboradores[229].

3.4.2 Medidas do peso corporal

O peso corporal foi avaliado no 1º dia da administração de AGP ω-3 e do AF em PND 45 para ajustar o volume das dosagens indicada para cada animal e no decorrer do experimento foram realizadas a pesagem dos animais duas vezes por semana para adequação das doses[230].

3.4.3 Acasalamento

Para o acasalamento, as fêmeas foram inseridas ao final do período de luz (19h) nas gaiolas dos machos, sempre introduzidas duas fêmeas para cada macho. Às 7h da manhã do dia posterior foi verificada prenhez por meio do lavado vaginal, que se caracteriza na introdução de cloreto de sódio através de uma pipeta plástica na vagina da fêmea, obtendo secreção para análise em microscópio óptico a procura de espermatozoides junto ao material biológico do animal[231]. Nas fêmeas que foram identificadas com a presença de espermatozoides considerou-se como dia gestacional zero (DG 0). Nas fêmeas consideradas agora como matrizes (prenhes) foram separadas e alocadas individualmente em sua gaiola moradia, ficando na mesma durante toda a gestação, período de 21 dias[232].

3.4.4 Indução do modelo animal de TEA

Para a caracterização do modelo animal de TEA, as matrizes foram divididas em dois grupos. Um dos grupos recebeu a administração ip de uma única injeção de LPS, obtido pela extração fenólica da *Escherichia coli,* sorotipo 0127: B8 (Sigma®), na dose de 100 µg/kg no DG 9,5 (nove dias mais doze horas), diluída em 50 µg/Kg de solução aquosa de NaCl 0,9% estéril[45,233], caracterizando o grupo experimental (LPS-tratados).

O segundo grupo recebeu apenas solução NaCl 0,9% estéril via ip no volume equivalente ao grupo experimental, caracterizando como grupo controle (Salina-tratados). A administração das substâncias ocorreu sempre no período vespertino (entre 15 – 17 horas).

3.4.5 Padronização da ninhada

Os partos aconteceram de forma natural e no dia pós-natal PND 1 e PND 2 não ocorreu nenhuma manipulação para evitar a possibilidade de rejeição da mãe em relação a prole. No terceiro dia após o parto foi realizada a sexagem e as ninhadas foram ajustadas em quatro fêmeas e quatro machos, totalizando 8 animais por ninhada. A distinção entre os gêneros foi atingida através da verificação da diferença visual relacionada a distância ano-genital, sendo maior em machos[234].

Os filhotes foram divididos em dois grupos conforme segue:

Grupo GA: formado por ratos machos e fêmeas procedentes de mães que receberam LPS.

Grupo GnA: formado por ratos machos e fêmeas, procedentes de mães que receberam solução salina.

Todos os animais permaneceram com suas mães até o PND 21, período final de aleitamento, onde foi realizado o desmame e as mães foram submetidas ao procedimento de morte indolor assistida (MIA), realizada pelo responsável técnico do biotério da UNISUL. Os animais permaneceram no biotério até o final dos procedimentos experimentais. Os filhotes foram divididos em sete grupos experimentais (n=10) conforme descrição na figura 4.

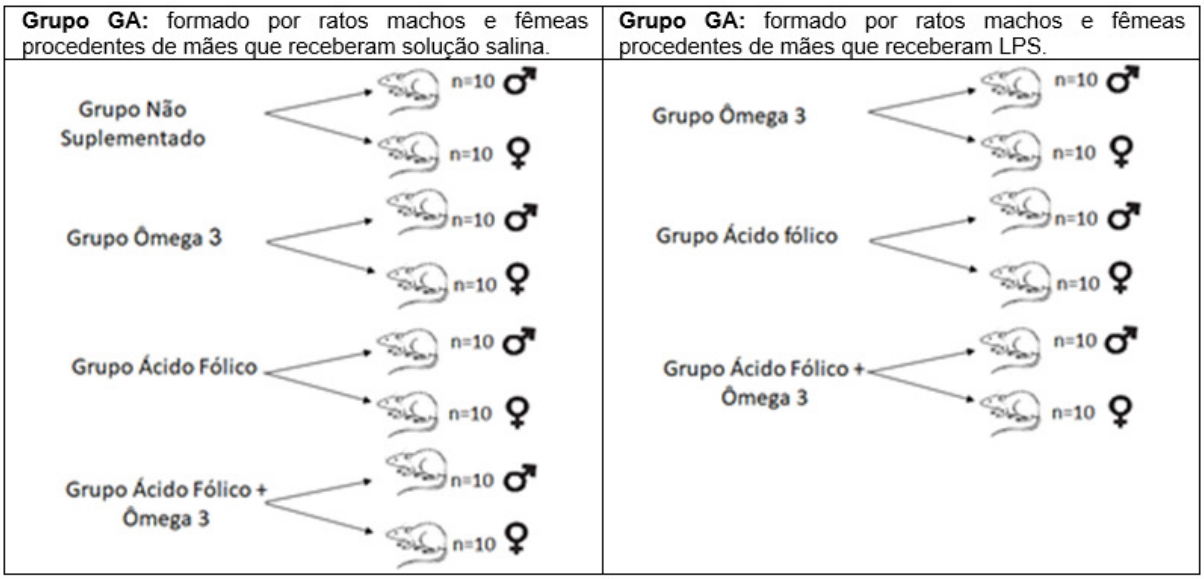

Figura 4 - Divisão dos grupos experimentais. GnA = grupos que receberam solução salina em período pré-natal. GA = grupos que receberam LPS em período pré-natal. Os grupos foram compostos por animais machos e fêmeas originários de mães suplementadas com AF e AGP ω-3, isolados ou combinados. Cada grupo foi representado por um n de 10 animais.

A síntese das etapas do delineamento experimental está descrita na Figura 5.

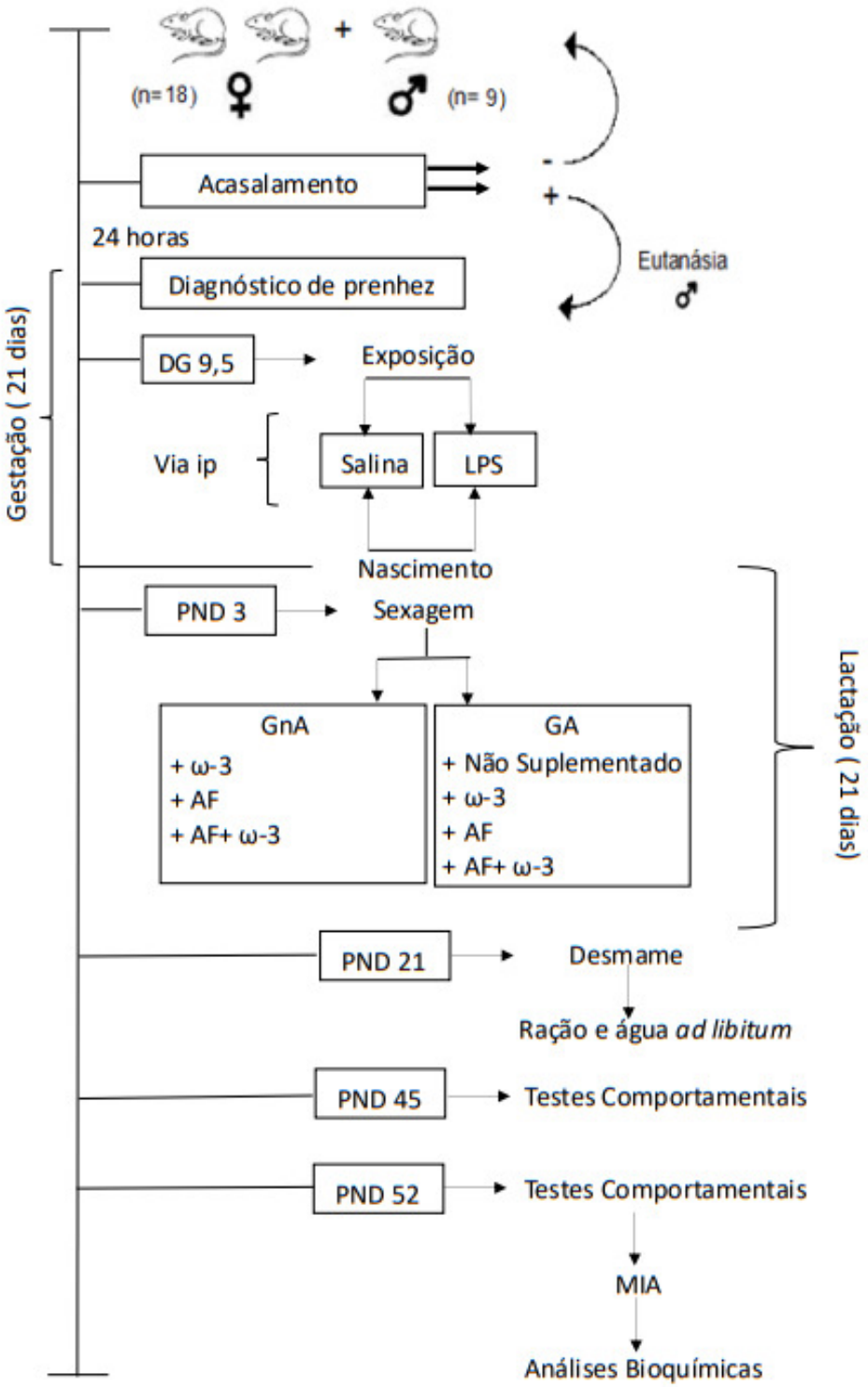

Figura 5 - Síntese das etapas do delineamento do estudo. O experimento iniciou com acasalamento (2:1 – fêmeas:macho), 24 horas após foi realizado o diagnóstico de prenhez, resultado positivo considerou-se DG 0. No DG 9.5, as ratas prenhes receberam administração de salina ou LPS para grupo controle ou experimental, respectivamente, via ip. No DG 21, nascimento da prole e em PND 3 foi executada a

sexagem. A prole de machos e fêmeas continuaram no experimento ficando com as matrizes até completar o período da lactação (PND 21). Os animais participantes do experimento foram divididos em grupos: Grupo GnA (Salina), AGP ω-3, AF e AF+AGP ω-3, compostos por ratos machos e fêmeas. Grupo GA (LPS) AGP ω-3, AF e AF+ AGP ω-3, compostos por ratos machos e fêmeas. Em PND 21, passaram pelo desmame e receberam água e ração *ad libitum*. Em PND 45, PND 52 e PND 59 foram realizados os testes comportamentais, posteriormente foi seguidos de MIA com dissecação do encéfalo para retirada do tecido (córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo) para as análises bioquímicas. Abreviaturas: DG = dia gestacional; ip = intraperitoneal; LPS = lipopolissacarídeo; GnA = grupo não autista; GA = grupo Autista; AGP ω-3 = ácido graxo poliinsaturado ômega 3; AF = ácido fólico; PND = dia pós-natal; MIA = morte indolor assistida

3.5 PROTOCOLOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados nos PND45, PND52 e PND59 com o objetivo de avaliar o efeito das substâncias no comportamento estereotipado, interação social, memória de habituação, memória de reconhecimento e na memória aversiva dos animais. Todos os testes foram conduzidos entre o período das 9:00 às 13:00 horas, em baixa iluminação e monitorados com câmera de vídeo. Antes de qualquer um dos procedimentos de avaliação comportamental os animais foram levados em suas gaiolas-moradia à sala de experimentação com 1 hora de antecedência – representando o período de habituação. Todos os equipamentos foram limpos com álcool 70% após o teste de cada animal, impedindo a permanência de odores.

3.5.1 Teste de Estereotipia

O teste de estereotipia seguiu as descrições de Battisti e colaboradores[235] e foi realizado em ratos adultos (PND 45). A estereotipia é definida pela permanência do animal em posição estacionária exibindo movimentos rápidos, repetidos da cabeça e membros dianteiros. O *grooming* estereotipado é dividido em quatro fases, na fase 1 os movimentos das patas dianteiras se concentram na região do nariz, na fase 2 os movimentos das patas podem ocorrer unilateralmente, na fase 3 as patas realizam

movimentos por cima da cabeça passando por cima das orelhas e seguindo em direção ao rosto, e na fase 4, ocorrem as lambidas no corpo do anima[236] (Figura 6). No presente estudo foi considerado as fases 1-3 de *grooming*.

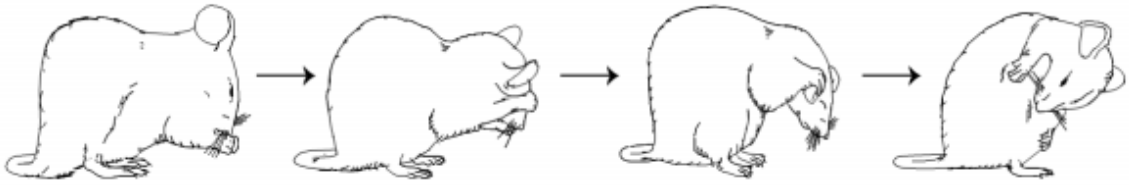

Figura 6 - Fases do grooming. Fase 1: série de movimentos simétricos em forma de elipse ao redor do nariz. As patas seguem alternando entre movimentos maiores e menores. Fase 2: movimentos unilaterais, cada movimento envolvendo uma pata, que alcançam até as vibrissas mistaciais abaixo dos olhos. Os ratos costumam fazer movimentos híbridos das Fases 1 e 2, em que uma pata faz o movimento unilateral da Fase 2, enquanto a outra pata faz um curto movimento elíptico da Fase 1. Fase 3: série de movimentos amplos bilaterais feitos simultaneamente com ambas as patas friccionando com a parte superior da cabeça. Patas se estendem por trás em direção ao pescoço e dão a volta para cima, ascendendo o suficiente para passar por cima das orelhas, deslizando juntas, em seguida, em direção à frente do rosto. Fase 4: movimentos prolongados de lambidas do corpo. As fases 1, 2 e 3 são conhecidas como lavagem da cabeça (retirado e adaptado de Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005)[236].

Os movimentos foram observados na gaiola durante 5 minutos. Os animais foram alocados em um aparato de campo aberto (60 x 60 x 30 cm), com três paredes de madeira e uma parede de vidro transparente. O piso sólido é dividido em doze quadrantes iguais. Os animais foram acomodados no quadrante superior esquerdo do campo aberto, de modo que ficassem de costas para o centro do campo. As imagens do comportamento do animal foram capturadas por uma webcam de 2.0 megapixels fixada em um tripé e acoplada em um notebook e armazenadas para posterior análise dos vídeos. Após o término de cada teste os animais foram retirados do aparato de campo aberto e devolvidos à gaiola-moradia.

3.5.2 Teste de Interação Social

O teste de interação social foi baseado na tendência natural dos roedores em investigar com maior dedicação um indivíduo intruso que lhe for apresentado pela primeira vez[237]. Os animais foram submetidos individualmente a interagir com outro animal desconhecido, sendo do mesmo sexo em uma caixa branca de acrílico (60 x 60 x 30 cm) por um tempo de 5 minutos. Foi realizada a quantificação do tempo de interação do animal que abrange os episódios de *grooming*, cheirar, seguir, chutar, socar, montar ou permitir a monta. As imagens do comportamento do animal foram capturadas por uma webcam 2.0 megapixels fixada em um tripé e acoplada em um notebook e armazenadas para posterior análise dos vídeos.

3.5.3 Teste de Memória de Habituação

O Teste de Memória de Habituação foi utilizado para quantificar os movimentos locomotores e de exploração dos animais. Foi quantificado os movimentos locomotores (*crossings*) correspondente aos deslocamentos de um ponto a outro da arena e os movimentos de exploração ou não locomotores (*rearings*), aqueles que o animal pode realizar sem a necessidade de deslocamento, por elevação vertical, e a auto-limpeza (*grooming*), que é caracterizada pela passagem das patas dianteiras sobre a cabeça[238]. Os animais foram alocados em uma caixa branca de acrílico (60 x 60 x 30 cm) por um tempo de 3 minutos. Foi realizada a quantificação dos movimentos *crossings* e *rearings*.

3.5.4 Teste de reconhecimento de objetos (TRO)

O TRO foi utilizado para o estudo da memória de reconhecimento em animais experimentais. Este teste baseou-se na tendência de os roedores explorarem um objeto novo, sendo que o desempenho de reconhecimento é derivado do tempo gasto na exploração dos estímulos[53]. O TRO vem sendo utilizado, cada vez mais, como ferramenta para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas e para avaliar efeitos de fármacos na memória[83]. O teste foi conduzido em três etapas:

1) Treino – Os animais foram alocados em uma arena, contendo dois objetos idênticos (A1 e A2) na região central, fixados com fita adesiva e separados por espaço suficiente para exploração de todas as faces.

2) Teste de memória de curta duração – Etapa realizada 90 minutos após o treino, onde o objeto A2 é substituído pelo B.

3) Teste de memória de longa duração – Etapa realizada 24 horas após o teste, onde o objeto B é substituído pelo objeto C.

Em todas as etapas do TRO os animais foram alocados no quadrante posterior esquerdo da arena, de costas para os objetos, após, ficaram livres para explorá-los durante três min[239].

O Índice de Reconhecimento é definido pela razão estabelecida a partir da proporção entre o tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar[240]. Exploração foi definida como encostar ou cheirar cada objeto durante as diferentes etapas do teste[241]. As imagens do comportamento do animal foram capturadas por uma webcam 2.0 megapixels fixada em um tripé e acoplada em um notebook e armazenadas para posterior análise dos vídeos. Após o término de cada teste, os animais foram retirados do aparato de campo aberto e devolvidos à gaiola-moradia.

3.6 PROTOCOLOS DE ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram submetidos ao protocolo de MIA. As estruturas de interesse (córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo) foram isoladas e armazenadas a -80°C para as análises bioquímicas que seguem:

3.6.1 Marcadores de dano oxidativo

Foram dosados os seguintes marcadores para verificação do dano oxidativo nas estruturas cerebrais:

3.6.1.1 Dano aos lipídios

O dano aos lipídios foram quantificados pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)[242]. Brevemente, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato (Nuclear) e desproteinizadas com ácido tricloroácetico 10% (Vetec) com centrifugação à 3.000rpm por 10min. A reação ocorre ao adicionar ácido tiobarbitúrico 0,67% ao sobrenadante e aquecido à 100℃ por 30min. A absorbância foi realizada em 532nm em espectrofotômetro utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich) como padrão externo. Os resultados expressos em nmol de MDA equivalente por mg de proteína.

3.6.1.2 Dano às proteínas

O dano oxidativo às proteínas foi quantificado pela determinação dos níveis de grupos carbonilas, através da reação com dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich)[243]. Brevemente, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroácetico 20% (Vetec) e redissolvidas em dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich). A absorbância foi realizada em 340nm em espectrofotômetro. Os resultados expressos em nmol/mg de proteína.

3.6.2 Normalização das dosagens

A quantificação de proteínas totais foram realizadas para normalização das dosagens realizadas. O método utilizado foi o proposto por Lowry e colaboradores[244], que utiliza albumina bovina sérica como padrão. A absorbância foi realizada em 700nm. Os resultados expressos em mg de proteínas.

3.7 VARIÁVEIS DE ESTUDO

No Quadro 1 estão descritas as variáveis utilizadas no desenvolvimento do projeto proposto.

Quadro 1 - Identificação de variáveis.

Nome da Variável	Tipo de Variável	Natureza	Unidade de medida
Dose AGP ω-3	Independente	Quantitativa contínua	g/100g
Dose AF	Independente	Quantitativa contínua	mg/kg
Estereotipia	Dependente	Quantitativa contínua	Número de *grooming*
Interação social (comportamento)	Dependente	Quantitativa contínua	Número de episódios e tempo de cada episódio
Memória de habituação	Dependente	Quantitativa Contínua	Tempo gasto na exploração
Reconhecimento de objetos (TRO)	Dependente	Quantitativa Contínua	Tempo gasto na exploração dos estímulos
Carbonilização de proteínas	Independente	Quantitativa contínua	nmol/mg
Ácido tiobarbitúrico (TBARS)	Independente	Quantitativa Contínua	nmol MDA/mL

3.8 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via e os grupos foram comparados pelo teste *pos-hoc* de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de $p<0,05$. O número de animais em cada grupo está baseado em estudos prévios.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL e sob o protocolo 16.045.4.01.IV, em 20 de março de 2017. A utilização dos animais seguiu a Diretriz Brasileira para Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Resolução Normativa nº 12, de 20 de setembro de 2013, publicado no Diário Oficial da União – Seção 1)[245].

4. RESULTADOS

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 Teste de interação social

Os prejuízos na interação social e comunicação representam os sintomas mais característicos do TEA[5]. No teste de interação social, com a participação de um animal intruso, foram avaliados os parâmetros de cheirar, montar (valores não apresentados), seguir (valores não apresentados) e permitir a monta. A prole composta por animais machos cujas mães foram suplementadas com AGP ω-3, AF ou ω-3+AF associados, expostos ao LPS em período pré-natal e avaliados em PND45, demonstram aumento significativo no parâmetro cheirar (tempo em segundos) quando comparados ao seu grupo controle (Figura 7A).

A suplementação materna com AF foi capaz de gerar uma prole de animais fêmeas com um comportamento de cheirar, em PND45, significativamente maior quando comparado ao grupo controle. No entanto, quando expostas ao LPS prenatalmente, os resultados demonstraram que o AF não foi capaz de alterar este parâmetro avaliado. Por outro lado, as suplementações maternas com AGP ω-3 e AGP ω-3+AF associados, resultaram em aumento no comportamento de cheirar na prole de fêmeas expostas ao LPS em período pré-natal quando comparadas ao seu grupo controle (Figura 7B).

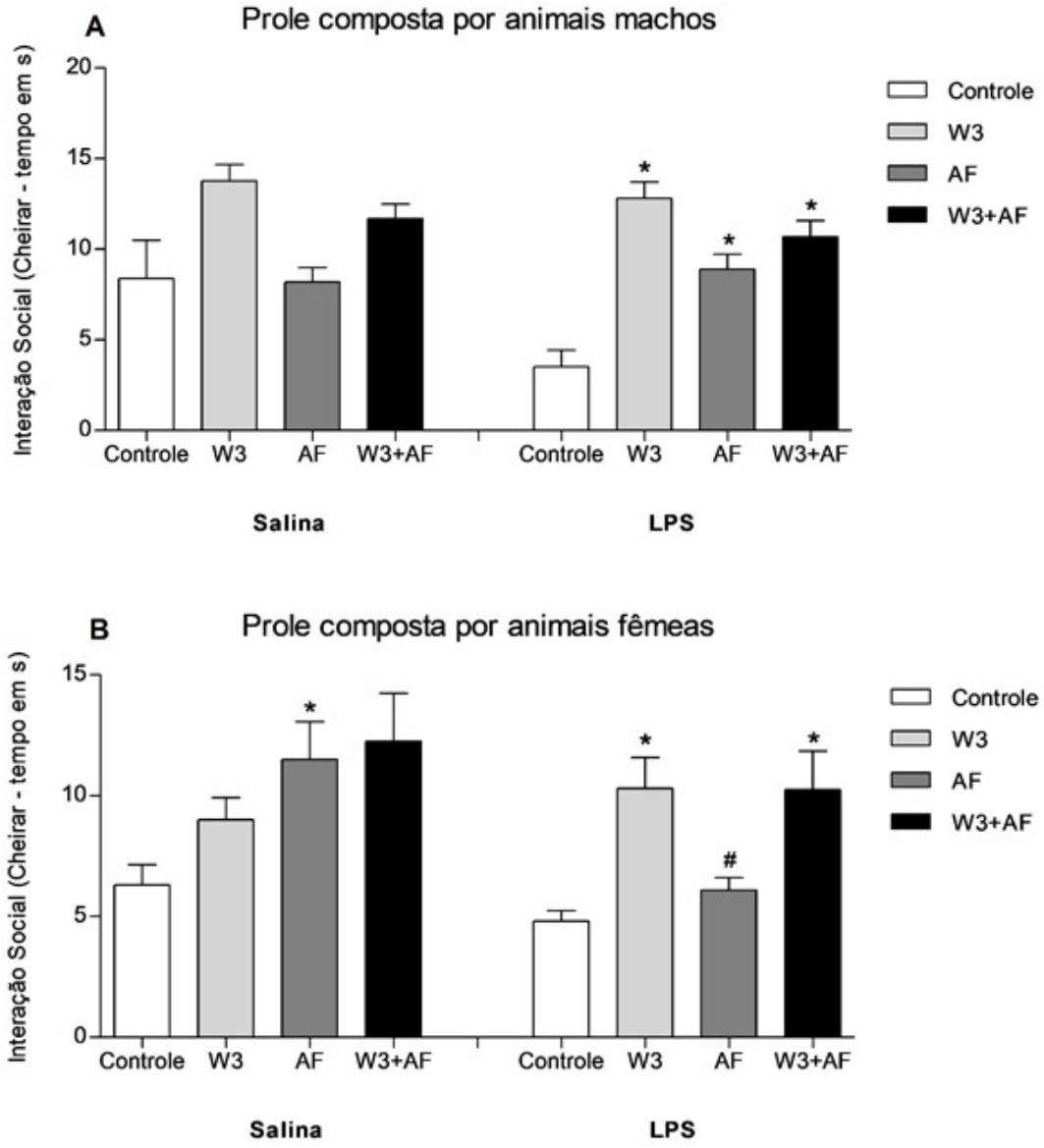

Figura 7 – Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de interação social - parâmetro de cheirar, na prole de animais machos (7A) e fêmeas (7B), em PND45, expostos ao LPS em período pré-natal. *Diferença significativa quando comparados aos respectivos grupos controle. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). #Diferença significativa entre os grupos AFxSAL e AFxLPS. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). Os dados foram expressos em média ± DP.

No parâmetro permitir a monta (número de episódios), os resultados demonstraram que a prole composta por animais machos cujas mães foram suplementadas com AGP ω-3+AF associados e avaliados em PND 45, demonstraram aumento significativo neste parâmetro quando comparados ao seu grupo controle. No

entanto, quando expostos prenatalmente ao LPS, nenhum dos grupos suplementados mostrou alterações significativas neste parâmetro de interação social (Figura 8A).

A suplementação materna com AGP ω-3 foi capaz de gerar uma prole de animais fêmeas com um comportamento de permitir a monta, em PND45, significativamente maior quando comparado ao grupo controle. No entanto, quando expostas ao LPS prenatalmente, os resultados demostraram que as suplementações maternas com AGP ω-3 e AGP ω-3+AF associados, resultaram em aumento no comportamento de permitir a monta quando comparadas ao seu grupo controle (Figura 8B).

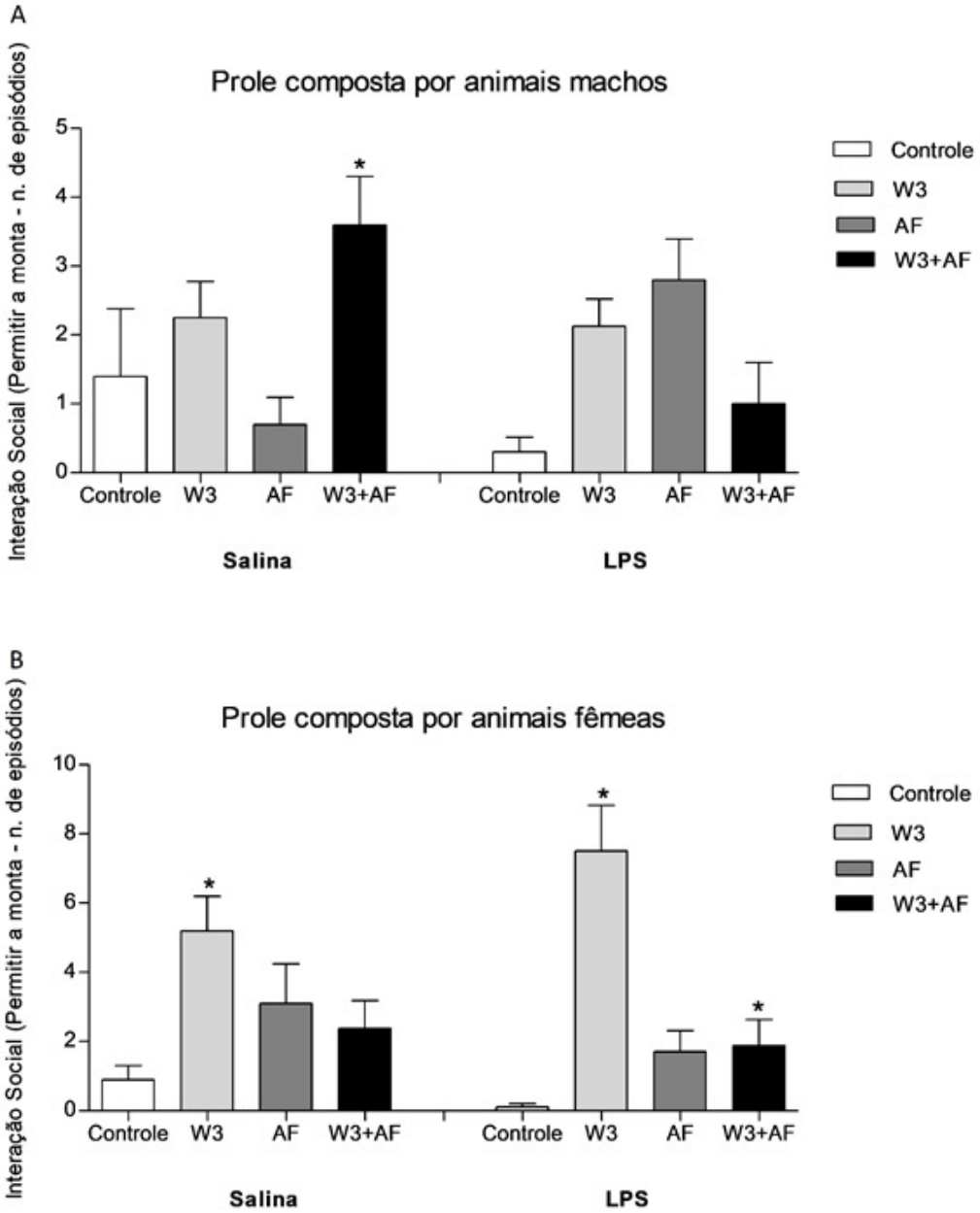

Figura 8 - Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de interação social – parâmetro permitir a monta, na prole de

animais machos (7A) e fêmeas (7B), em PND45, expostos ao LPS em período pré-natal. *Diferença significativa quando comparados aos respectivos grupos controle. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). Os dados foram expressos em média ± DP.

4.1.2 Teste de estereotipia

Atividade de *grooming* (movimento de autolimpeza) tem sido utilizada como um índice de comportamento repetitivo e estereotipado em estudos pré-clínicos do TEA[246]. Neste estudo, para o teste de estereotipia foram avaliados o tempo e o número de episódios da atividade de *grooming* da prole composta por machos e fêmeas expostos ou não ao LPS em período pré-natal.

A exposição pré-natal ao LPS não foi capaz de alterar significativamente o tempo e o número dos episódios de *groomings* tanto em machos quanto em fêmeas, avaliados em PND45. No entanto, quando avaliado o tempo de *grooming,* os resultados demostraram que os animais machos cujas mães foram suplementadas com AGP ω-3+AF associados, expostos ao LPS em período pré-natal, demostraram aumento significativo neste parâmetro quando comparados ao seu grupo controle. E ainda, quando comparados os grupos suplementados com AGP ω-3 isoladamente, os resultados apontaram uma diminuição significativa para este parâmetro (Figura 9A).

Número aumentado de episódios da atividade de *groomings* foram encontrados na prole de machos cujas mães foram suplementadas com AGP ω-3+AF associados tanto nos animais expostos ao LPS prenatalmente quanto nos animais não expostos, comparados aos seus respectivos grupos controles. Os grupos que receberam AGP ω-3 isoladamente, apresentaram diminuição significativa para este parâmetro quando comparados entre si. E ainda, os resultados mostraram que a suplementação isolada de AF diminuiu de forma significativa o número de episódios de *gromming* quando comparado com o grupo suplementado com AGP ω-3+AF associados (Figura 9B).

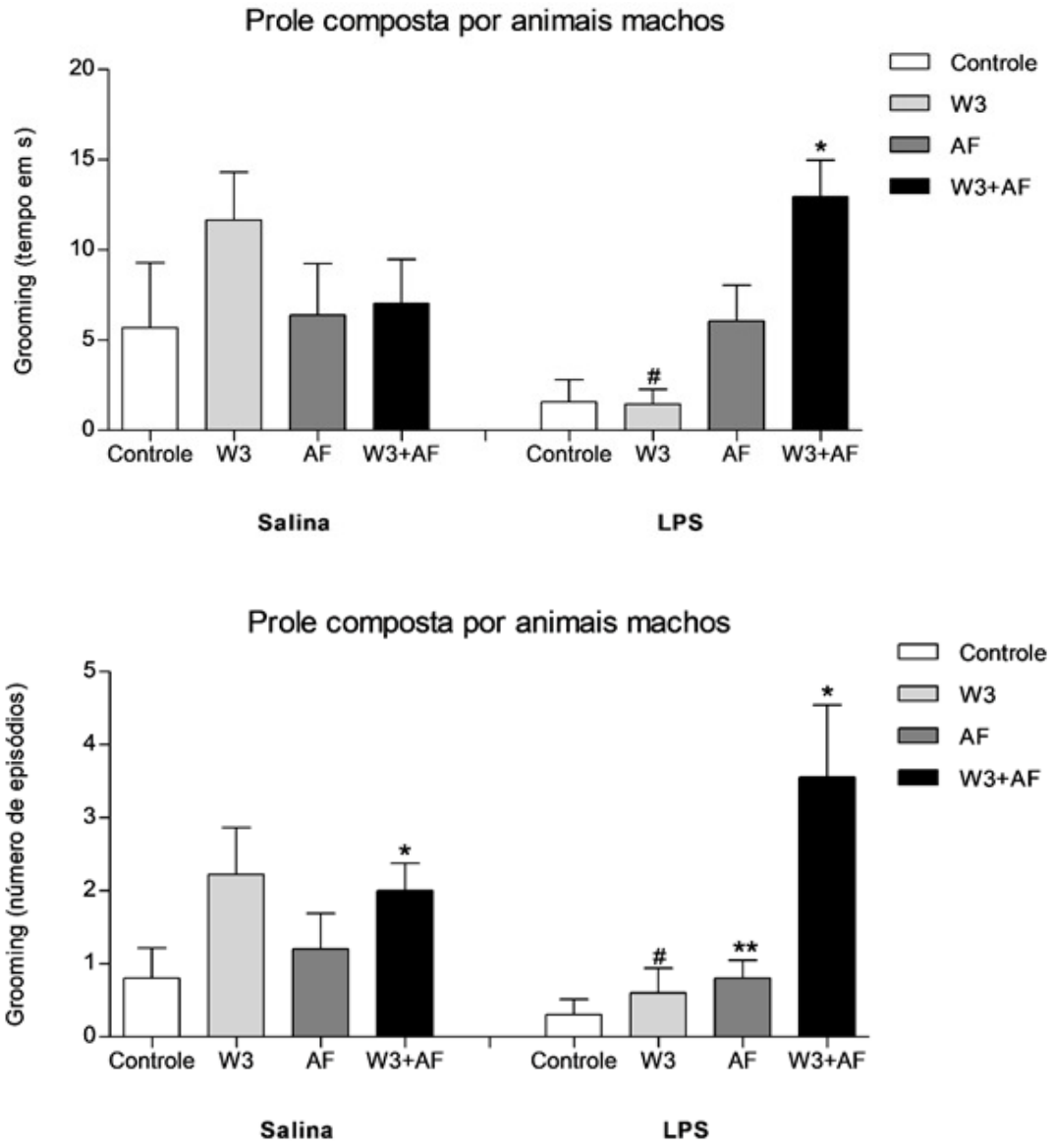

Figura 9 - Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de estereotipia – tempo em segundos (8A) e número de episódios (8B) de atividade de *grooming* na prole de animais machos em PND45, expostos ao LPS prenatalmente. *Diferença significativa quando comparados aos respectivos grupos controle. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). **Diferença significativa entre os grupos AFxLPS e ω-3+AFxLPS. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). # Diferença significativa entre os grupos ω-3xSAL e ω-3+LPS. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). Os dados foram expressos em média ± DP.

Nenhum dos protocolos de suplementação foi capaz de alterar significativamente o comportamento de *grooming* (tempo e número de episódios) nas

proles compostas por fêmeas expostas prenatalmente ao LPS ou a solução salina (Figuras 10A e 10B).

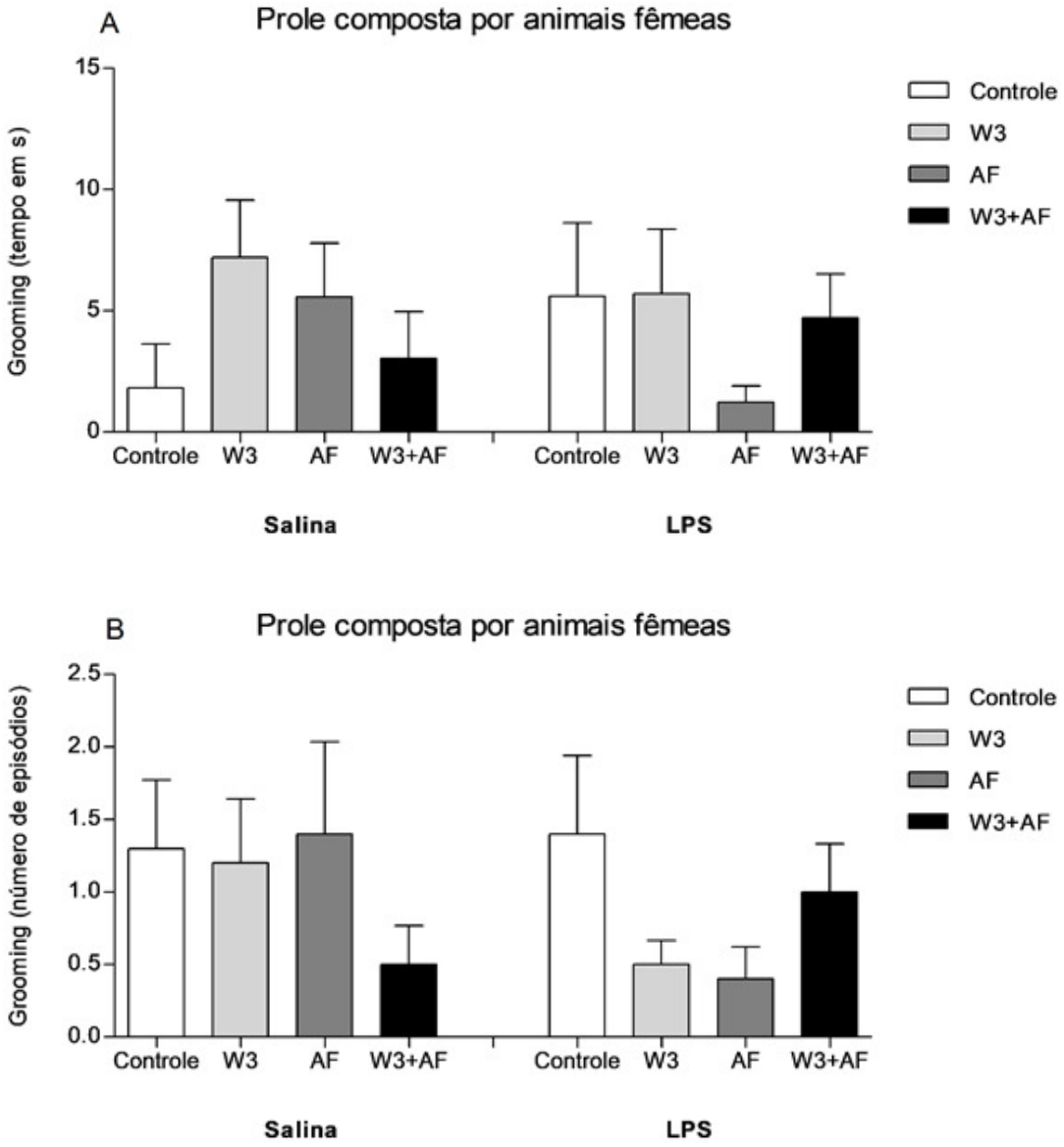

Figura 10 - Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AG ω-3+AF associados no teste de estereotipia – tempo em segundos (9A) e número de episódios (9B) de atividade de *grooming* na prole de animais fêmeas em PND45, expostos ao LPS em período pré-natal. Os dados foram expressos em média ± DP.

4.1.3 Teste de memória de habituação

O teste de habituação em campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade de exploração horizontal (número de *crossing*) nas proles compostas por animais machos

ou fêmeas, em PND52. Os resultados demostraram que os diferentes protocolos de suplementação materna utilizados neste estudo, não foram capazes de alterar significativamente o comportamento de exploração horizontal na prole composta por animais machos expostos ou não ao LPS prenatalmente (Figura 11A).

A prole composta por fêmeas cujas mães foram suplementadas com AGP ω-3 ou AF e expostas prenatalmente ao LPS, apresentaram um melhor desempenho no teste de habituação ao campo aberto a partir da redução significativa do número de *crossing* quando comparados os tempos das sessões de treino e teste. A comparação entre os diferentes protocolos de suplementação não demonstrou alterações significativas neste parâmetro (Figura 11B).

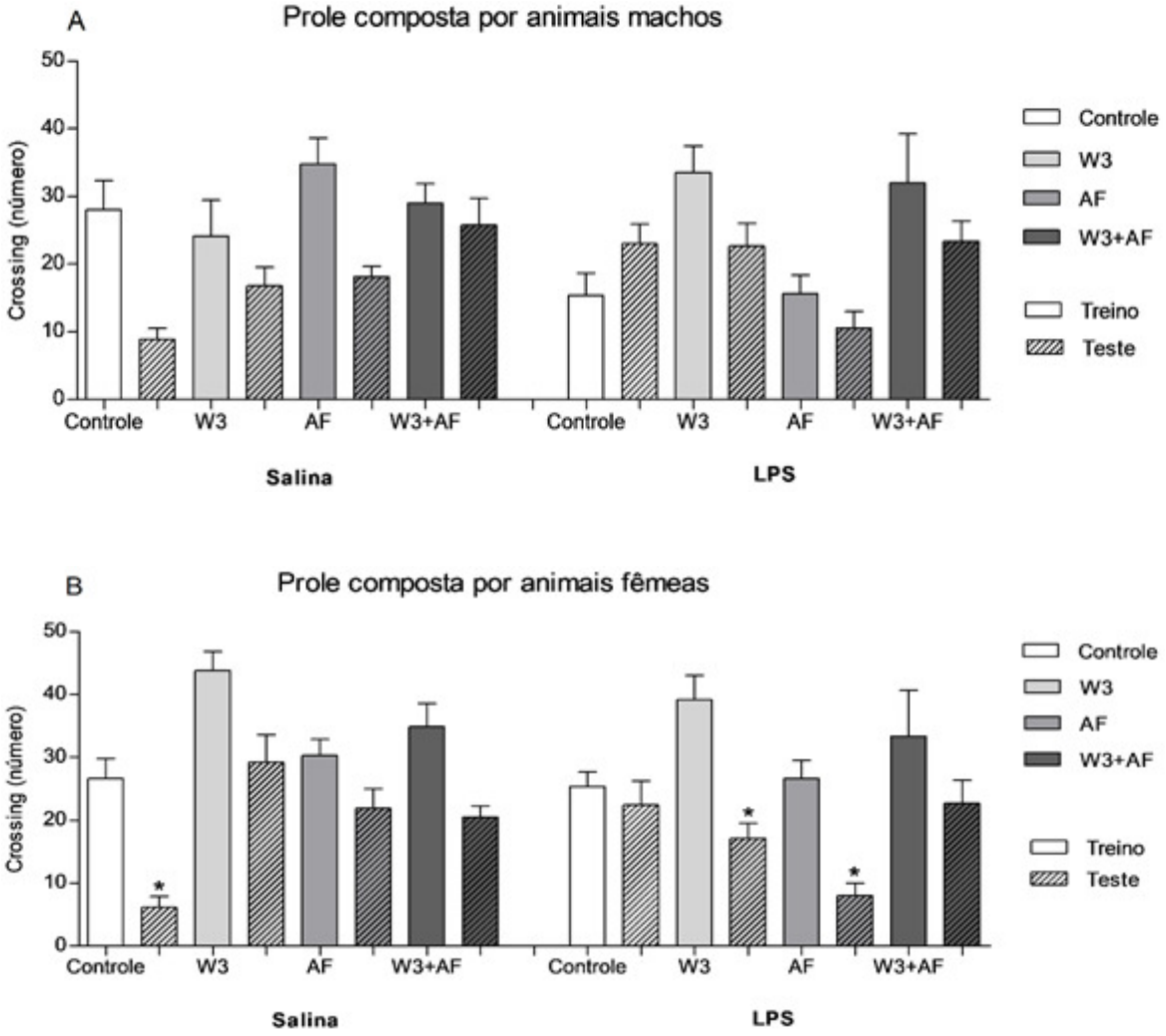

Figura 11 - Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de memória da habituação – atividade de exploração horizontal (*crossing*) na prole de animais machos (10A) e fêmeas (10B) em PND52, expostos ao LPS em período pré-natal. *Diferença significativa entre as sessões de treino e teste

nos grupos controle não exposto ao LPS, ω-3xLPS e AFxLPS. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). Os dados foram expressos em média ± DP.

4.1.4 Teste de memória de reconhecimento de objetos

O TRO foi utilizado para avaliar o desempenho cognitivo, através das memórias de curta (realizada 90 minutos após o treino) e de longa duração (realizada 24 horas após o treino), nas proles compostas por animais machos ou fêmeas.

Os resultados demostraram que nenhum dos protocolos de suplementação foi capaz de alterar significativamente o desempenho dos animais expostos prenatalmente ao LPS ou a solução salina, na memória de curta duração (Figuras 12A e 12B) e na memória de longa duração (Figuras 13A e 13B) quando avaliados em PND52.

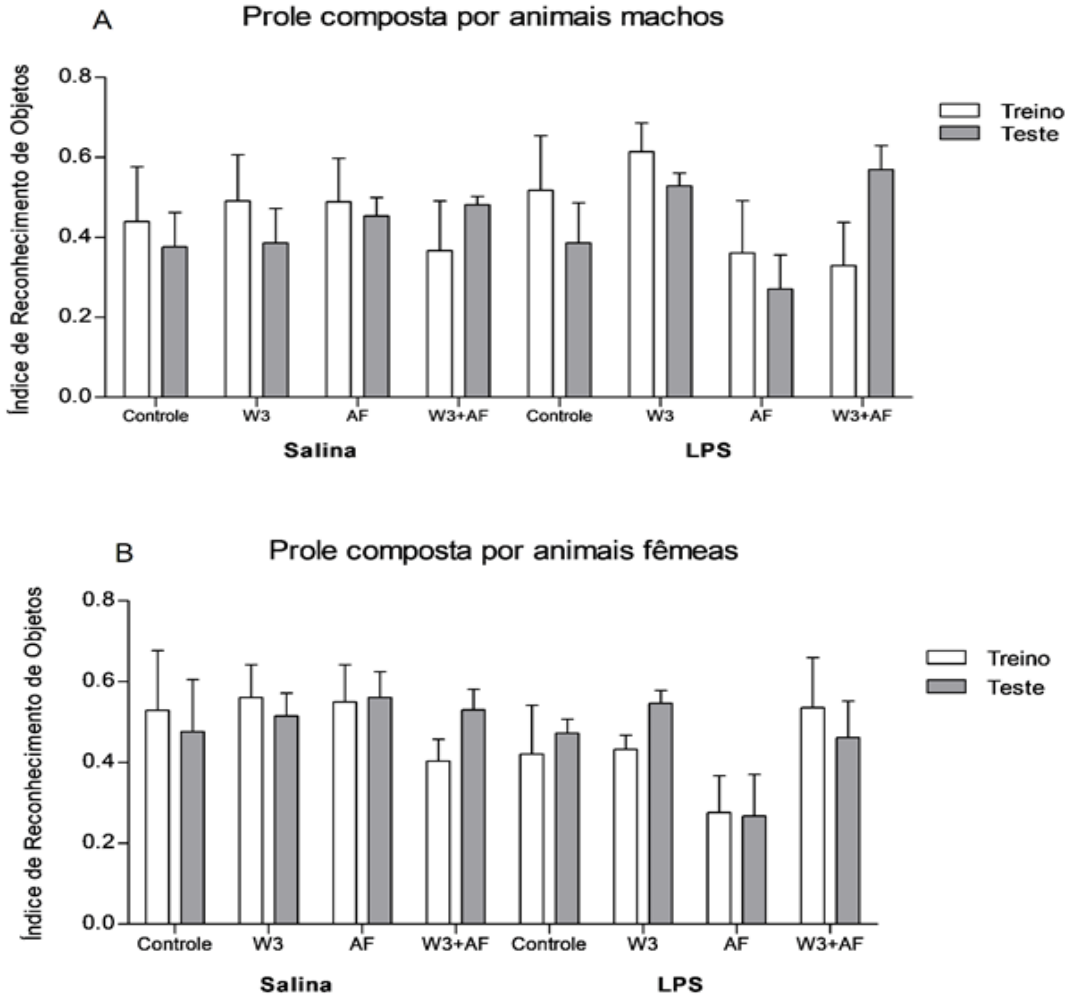

Figura 12 - Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de reconhecimento de objetos, avaliados em PND52. A memória

de curta duração foi considerada 90 minutos após o treino na prole de animais machos (12A) e fêmeas (12B). Os dados foram expressos em média ± DP.

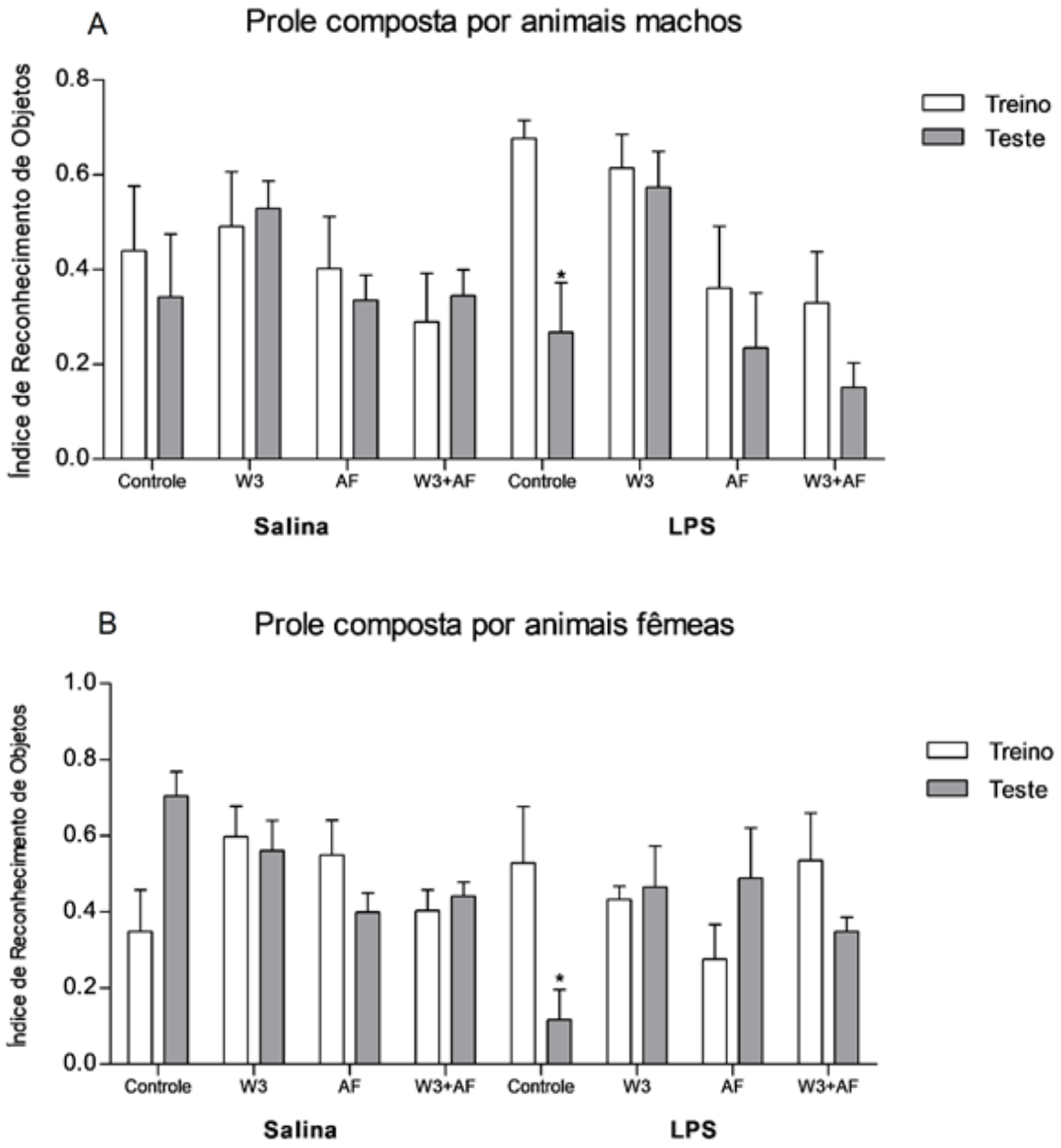

Figura 13 - Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados no teste de reconhecimento de objetos, avaliados em PND52. A memória de longa duração foi considerada 24 horas após o treino na prole de animais machos (13A) e fêmeas (13B). Os dados foram expressos em média ± DP.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.2.2 Dano aos lipídios

A medida de dano oxidativo em lipídios foi avaliado a partir da concentração de MDA em cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal, nas proles compostas por animais machos ou fêmeas, cujas mães foram suplementadas com AGP ω-3, AF ou AGP ω-3+AF associados e expostos ao LPS ou solução salina em período pré-natal.

Os resultados demonstram que a prole composta por machos expostos ao LPS prenatalmente houve um aumento significativo na concentração de MDA em cerebelo ($P<0,05$) e córtex pré-frontal ($P<0,001$) quando comparados ao seu grupo controle. No entanto, os grupos que receberam AGP ω-3 isoladamente e foram expostos ao LPS prenatalmente, apresentaram um aumento na concentração de MDA no hipocampo ($P<0,001$) quando comparados com os animais suplementados com o mesmo protocolo, mas sem a exposição ao LPS. Por outro lado, a suplementação isolada de AF e a suplementação associada de AGP ω-3+AF diminuiu a concentração de MDA no hipocampo ($P<0,001$) quando comparados com a suplementação isolada de AGP ω-3 (Figura 14A).

Na prole composta por fêmeas, a suplementação materna com AF e AGP ω-3+AF associados, foi capaz de diminuir a concentração de MDA em cerebelo ($P<0,05$) quando comparado ao grupo suplementado com somente com AGP ω-3. No entanto, no córtex pré-frontal a suplementação materna com AGP ω-3+AF associados aumentou significativamente a concentração de MDA quando comparado ao grupo não suplementado. Níveis mais baixos de MDA foram encontrados no córtex pré-frontal de animais expostos prenatalmente ao LPS cujas mães foram suplementadas com AF isoladamente. Além disso, a suplementação de AGP ω-3+AF associados foi capaz de reduzir a concentração de MDA no cerebelo de animais expostos ao LPS e comparados ao grupo controle e aos grupos suplementados com AGP ω-3 ou AF isolados (Figura 14B).

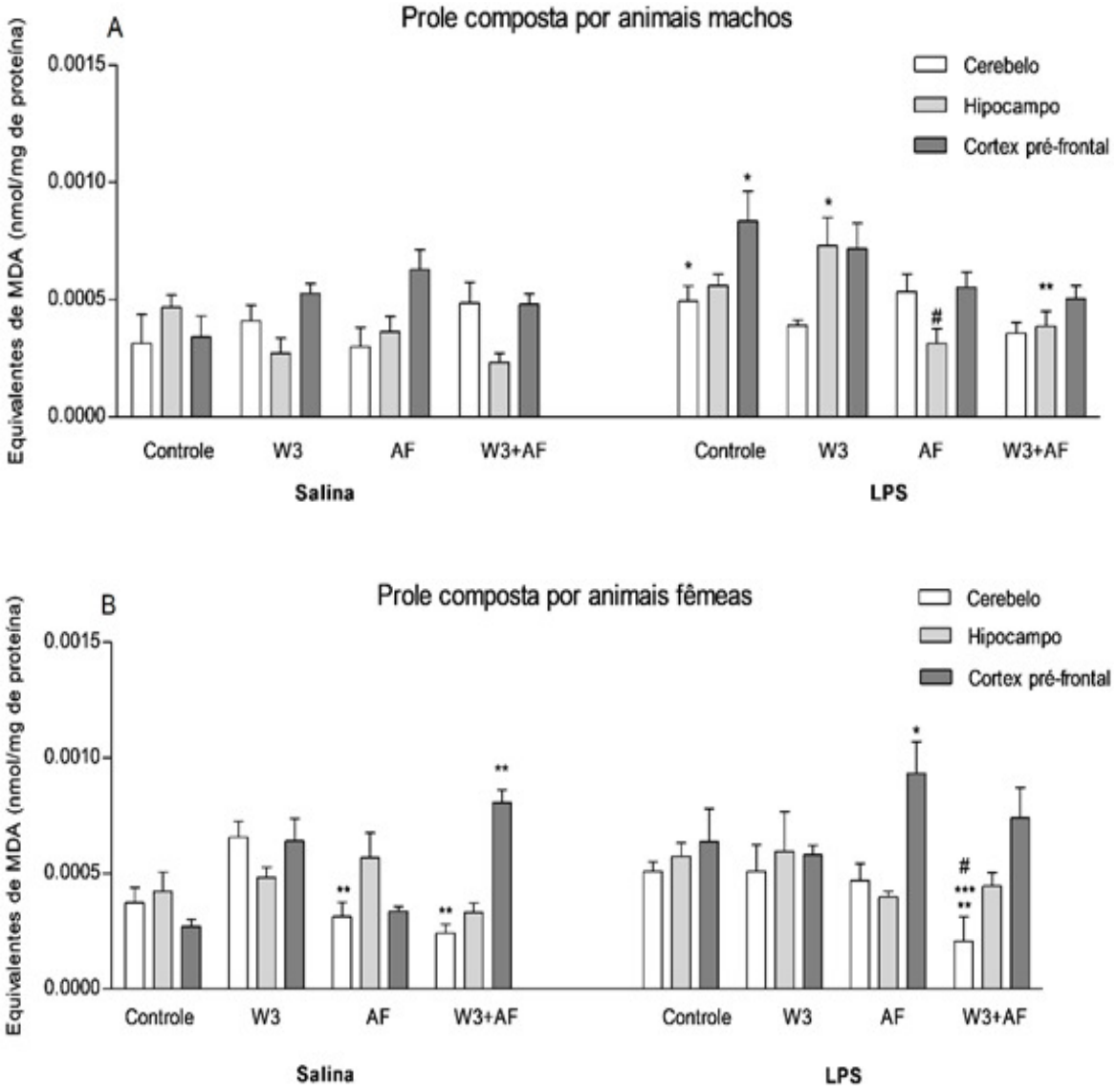

Figura 14 - Efeitos das suplementações maternas de AGP ω-3, AF e AGP ω-3+AF associados na medida de dano oxidativo em lipídios com a concentração de MDA em cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal na prole de animais machos (13A) ou fêmeas (13B), expostos ao LPS em período pré-natal. *Diferença significativas entre entre os grupos AFxSAL e AFxLPS. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). **Diferença significativa entre os grupos controlexSal e ω-3+ AFxSAL, ω-3xSal e AFxSal, ω-3xSal e ω-3+ AFxSal, ω-3xLPS e ω-3+ AFxLPS. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). ***Diferença significativa entre os grupos AFxLPS e ω-3+ AFxLPS. P<0,01 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). # Diferença significativa entre os grupos ControlexLPS e ω-3+ AFxLPS. P<0,01 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). Os dados foram expressos em média ± DP.

4.2.2 Dano às proteínas

A medida de dano oxidativo em proteínas do grupamento carbonil foi avaliado em cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal, na prole composta por animais machos ou fêmeas, cujas mães foram suplementadas com ω-3, AF ou ω-3+ AF associados, e expostos ao LPS ou solução salina em período pré-natal.

A suplementação com ω-3 e AF foi capaz de promover uma diminuição no dano oxidativo as proteínas no córtex pré-frontal ($P<0,05$) da prole de animais machos quando comparado aos grupos que receberam a suplementação de AF e ω-3 isoladamente. No córtex-frontal de animais expostos prenatalmente ao LPS a suplementação com ω-3 foi capaz de diminuir a concentração de proteínas carboniladas quando comparado ao grupo não suplementado. Resultados semelhantes quando comparados os grupo ω-3xLPS e AFxLPS ou ainda ω-3xLPS e ω-3+AF associados (Figura 15A).

Na prole de animais fêmeas nenhum dos protocolos de suplementação foi capaz de alterar a medida de dano oxidativo em proteínas do grupamento carbonil. O LPS não foi capaz de induzir dano oxidativo as proteínas em nenhuma das estruturas avaliadas (Figura 15B).

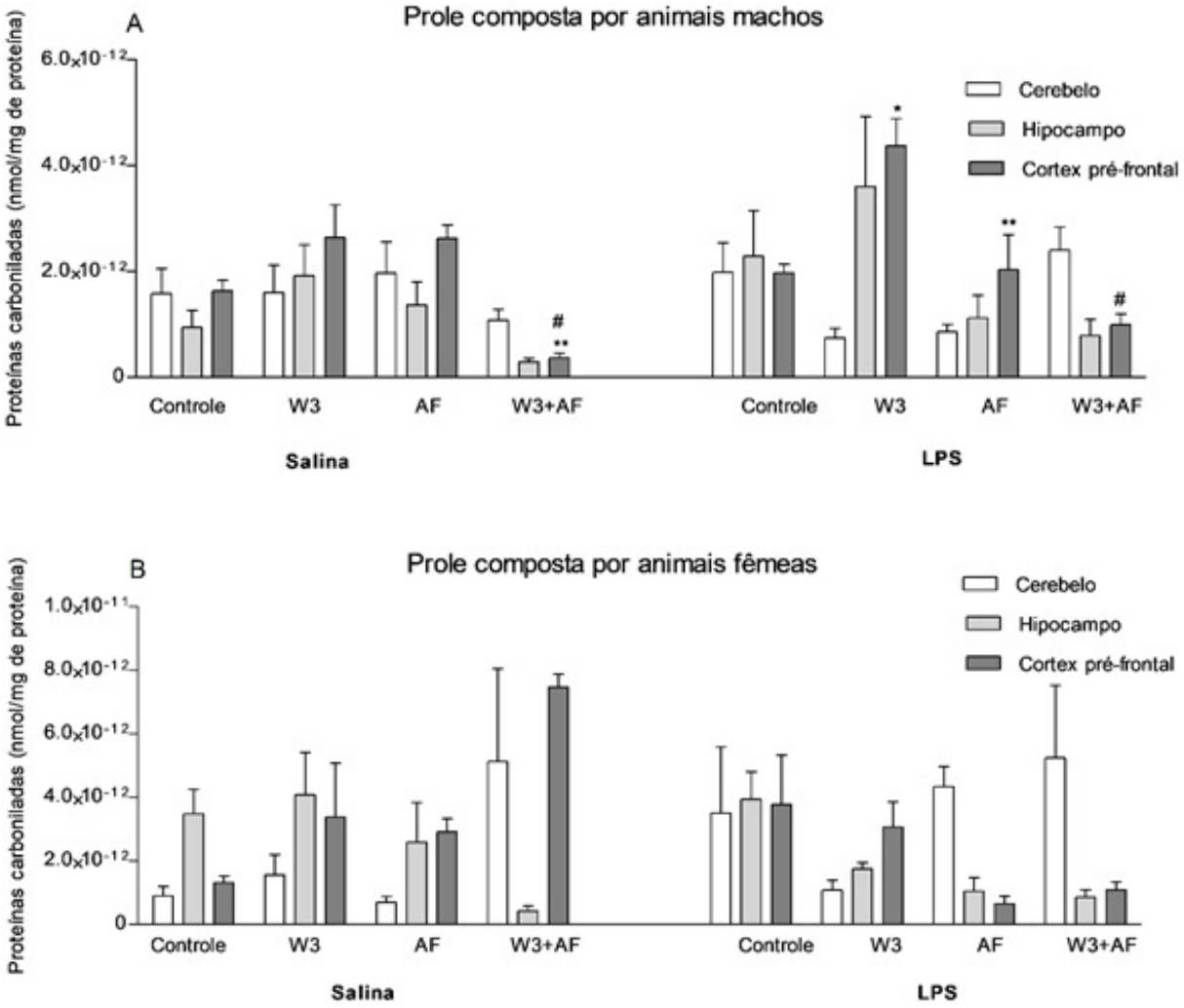

Figura 15 - Efeitos das suplementações maternas de ω-3, AF e ω-3+ AF associados na medida de dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil em cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal na prole de animais machos (14A) ou fêmeas (14B), expostos ao LPS em período pré-natal. *Diferença significativas entre os grupos controlexLPS e ω-3xLPS. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). **Diferença significativa entre os grupos, ω-3xLPS e AFxLPS e ω-3xSalina e ω-3+AFxSalina. P<0,05 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). # Diferença significativa entre os grupos ControlexLPS e ω-3xLPS e ω-3+ AFxLPS. P<0,01 (ANOVA + *post hoc* Tuckey). Os dados foram expressos em média ± DP.

5. DISCUSSÃO

Durante os períodos pré e pós-natais, os sistemas neurais são vulneráveis a eventos estressores ambientais, como as deficiências nutricionais, má alimentação materna, inflamação ou infecção[247]. Esses eventos aumentam o risco do desenvolvimento de doenças do neurodesenvolvimento, déficits nas funções executivas, problemas comportamentais e emocionais, além de alterações estruturais e funcionais do SNC[196,248]. As infecções maternas e a inflamação durante esse período crítico do desenvolvimento fetal ativam vias inflamatórias liberando vários biomarcadores pró-inflamatórios, como as citocinas, predispondo o desenvolvimento de doenças neurológicas como o TEA[249].

O TEA é um transtorno multifatorial, onde as características e a etiologia são complexas e hetereogêneas[250]. Cerca de 75% dos pacientes sofrem de comorbidades associadas, como transtorno do déficit de atenção, TDAH, ansiedade, transtorno bipolar, depressão, entre outros[251]. Os critérios de diagnósticos se concentram em dois domínios principais: os prejuízos da comunicação social e interesses restritos, e padrões restritos e repetitivos de comportamento[3].

A administração pré-natal de LPS no DG9,5 tem sido apresentada como um modelo pré-clínico da doença em função de sua capacidade de induzir o aumento de citocinas pró-inflamatórias que agem como mediadores inflamatórios no SNC e que trazem, como consequência, modificações na proliferação celular, alterações no processo de diferenciação e migração celular e na maturação sináptica[9]. Essas alterações são capazes de induzir mudanças comportamentais semelhantes aquelas encontradas no TEA[45,233].

Os tratamentos farmacológicos disponíveis para o TEA incluem psicoestimulantes, antipsicóticos, antidepressivos e agonistas do receptor alfa-2 adrenérgico e resultam, na maioria das vezes, no alívio dos sintomas ou no tratamento dos sintomas das comorbidades associadas ao TEA[20,195]. Nos últimos anos, os nutracêuticos têm sido apontados como uma alternativa interessante para o tratamento de doenças neurológicas e psiquiátricas[250], pois agem como reguladores das estruturas e funções do SNC[20,233]. Neste grupo, surgem como alternativas não farmacológicas, o AF e o AGP ω-3.

O AF e ω-3, atuam em processos cerebrais como neurogênese, diferenciação neuronal, mielinização e sinaptogênese[247]. A suplementação com AF tem sido associada a uma melhora da função cognitiva, além de possuir um importante papel no aumento das concentrações plasmáticas de DHA e EPA[252]. Neste sentido, o presente estudo investigou a ação neuroprotetora da suplementação materna e durante a lactação com ω-3 e do AF isolados ou combinados sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos na prole de ratos Wistar expostos ao LPS em período pré-natal.

Umas das condições clínicas mais prevalentes no TEA é a diminuição na interação social, manifestada por isolamento ou comportamento social impróprio, dificuldade em participar de atividades em grupo, indiferença afetiva ou demonstrações inapropriadas de afeto e falta de empatia social[253]. O teste de interação social foi conduzido na prole composta por animais machos e fêmeas e os resultados demostraram que a exposição pré-natal ao LPS reproduziu comportamento tipo-autista para os parâmetros de cheirar e permitir a montar. O prejuízo na interação social na prole composta por animais machos expostos ao LPS em período pré-natal, e apresentados neste estudo, foram semelhantes aos resultados de Specer e colaboradores[233], Hava e colaboradores[254] e replicados por Kirsten e colaboradores[45]. Os resultados na interação social na prole de fêmeas foram contrários aos estudos anteriores. No estudo de Kirsten e colaboradores[45], os animais foram isolados previamente antes do teste de interação social, o que não ocorreu no presente estudo, podendo ter contribuindo para as diferenças comportamentais observadas entre os machos e as fêmeas[255]. O isolamento prévio tem um importante papel no comportamento social dos animais[256]. O prejuízo na interação em animais expostos ao LPS, tendem a uma melhor resposta ao teste quando isolados previamente, resultando em comportamentos menos agressivos, como no parâmetro de permitir a monta avaliado. Quando testados sem isolamento, os resultados são conflitantes com estudos já realizados como nos resultados apresentados pelas fêmeas[42].

As diferentes anormalidades comportamentais e bioquímicas da ativação imune materna, depende da natureza e do momento do insulto inflamatório. O LPS induz a produção de citocinas pró-inflamatórias que induzem o processo inflamatório do SNC[257]. A reação em cascata promovida pelo LPS, ativa macrófagos e a micróglia, que como consequência estimula a produção e expressão de genes ligados diretamente ao processo inflamatório como fator de necrose tumoral (TNF-α),

interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6)[109]. As citocinas pró-inflamatórias produzidas no útero e na placenta são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica acessando o SNC do feto em desenvolvimento[257]. Como consequência, apresenta alterações comportamentais na prole a longo prazo, prejuízo na interação social, na memória e na atividade motora[258,259].

Sendo assim, a diminuição na interação social observados neste estudo demonstram que o LPS foi capaz de comprometer o desenvolvimento neurológico induzindo um comportamento tipo-autista na prole. Contudo, a suplementação materna com ω-3 e AF, isoladamente ou de forma associada, foi capaz de proteger contra o prejuízo da interação social tanto em animais machos quanto em fêmeas. Weiser e colaboradores[260], demonstraram que a suplementação materna com ω-3 no período gestacional e na lactação, protegeu a prole dos efeitos deletérios da exposição gestacional ao poly-IC (*Polyinosinic:polycytidylic acid*) em modelo de ativação imune materna. A prole demostrou melhor desempenho nos testes de interação social e do campo aberto, sugerindo que os níveis de DHA na dieta durante a gestação e lactação protege o neurodesenvolvimento aos insultos ambientais como as infecções maternas. O DHA em especial é encontrado no tecido neural e é importante para o desenvolvimento cerebral, especialmente no final da gestação[260]. Especificamente o ω-3 tem efeito imunomodulador exercendo propriedades antiinflamatórias[196]. Uma vez que a exposição a infecção materna produz uma resposta inflamatória, o DHA pode inibir a resposta devido as ações protetoras e imunológicas como as neuroprotectinas e as resolvinas[261] metabólitos presentes no DHA que agem após o insulto inflamatório modulando os processos neuronais e fisiológicos contribuindo na melhora do comportamento tipo autista como na interação social[148,196].

Estudos em animais tem demonstrado que a deficiência de ω-3 tem sido associada a alterações comportamentais e neuroquímicas semelhantes aos indivíduos com TEA, como alterações na neurotransmissão GABAérgica, dopaminérgica e colinérgica[262–264]. Além do desenvolvimento de alterações comportamentais, como diminuição nas interações sociais[265–267] e aumento da ansiedade[266] em animais. Esses resultados demonstram que níveis adequados de DHA na dieta, especialmente durante os períodos gestacional e na lactação, protegem o desenvolvimento do SNC das consequências dos insultos ambientais como a infecção materna[260].

Além disso, Degroote e colaboradores[268], avaliaram a deficiência de folato materno e o desenvolvimento de alterações comportamentais e bioquímicas semelhantes ao TEA. De acordo com os autores a alteração periconcepcional no metabolismo de um carbono induzida por uma dieta deficiente de folato, como consequência os animais apresentam malformação congênita, redução da interação social, diminuição na atividade de labirinto em cruz elevado, comportamento de ansiedade e aumento dos movimentos estereotipados, além de alterações nas atividades sensório motoras. Essas alterações nos níveis de folato materno podem estar relacionadas a alteração da metilação do DNA prejudicando o desenvolvimento neural e provocando alterações comportamentais[268]. Portanto, os resultados obtidos neste estudo são semelhantes ao estudo de Li e colaboradores[269], que sugere que a suplementação materna com AF aumenta o potencial de metilação do DNA no SNC, melhorando o desenvolvimento e o comportamento da prole. A metilação do DNA é importante durante o início do período gestacional, pois possui importante papel na regulação epigenética determinante para o desenvolvimento do SNC a longo prazo[269].

Outra condição clínica relevante observada no TEA, são os padrões restritos e repetitivos de comportamento[3,270]. Na pesquisa pré-clínica, a manifestação do comportamento estereotipado se dá pela avaliação da frequência e tempo de *grooming,* este parâmetro se assemelha aos comportamentos restritos e repetitivos apresentados por indivíduos com TEA[45]. De acordo com Jolles e colaboradores[271], o *grooming* é um comportamento natural de limpeza do animal, no entanto, pode ocorrer como uma reação a estímulos geradores de estresse ou ansiedade. Ocorre de forma espontânea envolvendo lambidas das patas até a cauda e os genitais, contudo, quando um fator de estresse é induzido ou gerado ocorre com movimentos fixos e persistentes, ou seja, um padrão estereotipado[270].

O teste de estereotipia foi conduzido neste estudo nas proles compostas por animais machos e fêmeas. Os resultados demostraram que a exposição pré-natal ao LPS não foi capaz de reproduzir um aumento significativo nos parâmetros considerados neste teste. Kirsten e colaboradores colaboradores[45,272], afirmam que a exposição ao LPS afeta as fases 1-3 do *grooming*, mas não afeta a lavagem do corpo ou fase 4. Apenas a limpeza da cabeça foi aumentada pela exposição pré-natal ao LPS, enquanto que a limpeza corporal não foi afetada. A deficiência dopaminérgica pode explicar os prejuízos comportamentais encontrados em indivíduos autista[273]. Tendo em vista que nos animais os movimentos estereotipados podem estar

relacionados a um desequilíbrio entre vias hiperativadas dopaminérgicas, as vias pouco ativadas GABAérgicas e as vias inibitórias colinérgicas[270,274]. Portanto, é possível que a redução na atividade dopaminérgica no hipotálamo e o aumento da higiene observados no estudo, se deva as alterações entre os sistemas dopaminérgicos e ocitonérgicos[273]. No entanto, as diferenças observadas nos resultados comportamentais nos animais machos podem ainda estarem relacionadas ao período em que o insulto foi aplicado, visto que, a exposição a um insulto ambiental pode produzir efeitos diferentes no SNC dependendo do momento que ele ocorre[263], afetando de maneira diferente os animais de uma mesma prole[275].

Nas fêmeas, a ausência de comportamento estereotipado foi semelhante aos achados de Xuan e colaboradores[255]. De qualquer forma, a falta ou ausência de estereotipia das fêmeas não excluem outras formas de comportamento restritivo e estereotipado, mas que não foram avaliados neste estudo[255].

No entanto, nos machos provenientes de mães que receberam suplementação com ω-3 + AF associados, apresentaram um aumento no tempo e número de episódios de *grooming*. E a suplementação materna com ω-3 isoladamente, foi capaz de diminuir estes parâmetros de estereotipia. Estes resultados foram semelhantes aos achados de Matsui e colaboradores[276], no qual foram utilizados camundongos geneticamente modificados com comprometimento na interação social e apresentando comportamento estereotipados que foram atenuados pela suplementação com DHA. Segundo os autores, os prejuízos comportamentais como a estereotipa apresentados pelos animais pode estar relacionado a alterações dopaminérgicas e que a suplementação materna com DHA influência a disponibilidade de dopamina, atenuando os sintomas comportamentais. A hiperativação dopaminérgica está envolvida nas alterações neuroquímicas e comportamentais apresentadas nos transtornos neurológicos[276]. Resultados semelhantes foram encontrados por Kokacya e colaboradores[277], demostraram que a suplementação com DHA e EPA diminuíram significativamente o comportamento estereotipado induzido pela apomorfina em modelo animal de esquizofrenia.

De acordo com um estudo realizado com crianças com TEA entre cinco e dezessete anos que foram suplementadas com ω-3 durante 6 semanas, demostraram que a suplementação atenuou os sintomas comportamentais de TDAH e estereotipia, sendo assim, a suplementação com AGP ω-3 pode ser um tratamento eficaz para os sintomas comportamentais apresentados no TEA[278]. Neste estudo, a suplementação

materna com AF isolado foi capaz de diminuir o número de episódios de *groomings* na prole de animais machos, sugerindo que o AF desempenha um importante papel na plasticidade neuronal, além possuir efeito neuroprotetor[279].

Os indivíduos com TEA limitam-se ao seu campo de interesse e não demonstram atenção ao que não lhe interessa e ao ambiente a sua volta ou que não fazem parte de sua rotina[233,280]. O desinteresse às novas experiências na esfera ambiental foi encontrado neste estudo com teste de memória de habituação em campo aberto[281]. Os resultados demostraram que a exposição pré-natal ao LPS produziu comportamento tipo-autista apenas na prole composta por fêmeas. Corroborando com esses achados, um estudo conduzido por Vojtechova e colaboradores[282], avaliou os efeitos da ativação imune materna no comportamento de animais machos através dos testes de interação social, memória de habituação em campo aberto e a resposta emocional e cognição dos animais. Os autores concluíram que o LPS não interferiu no comportamento dos animais, apenas a resposta emocional foi afetada através do teste vocalização ultrassônica.

Além disso, Tenk e colaboradorados[283] avaliaram as diferenças entre machos e fêmeas expostos ao LPS no período neonatal, os animais foram submetidos ao teste de memória de habituação e a atividade motora e exploratória dos animais. Os machos exibiram menor atividade exploratória em relação as fêmeas, essas evidências demonstram evidências importantes de dimorfismo sexual nos efeitos a longo prazo da exposição ao LPS neonatal. De acordo com Lynn e colaboradores[284], as fêmeas jovens exploram e se locomovem mais que os machos no campo aberto, isso se deve, as diferenças do desenvolvimento neural, além da idade e sexo dos animais. Podendo assim possuir uma maior tolerância frente a exposição ao LPS a longo prazo, que pode estar relacionada a fase do ciclo estral e do sistema fisiológico das fêmeas[285].

No entanto, a suplementação materna com ω-3 ou AF isoladamente na prole de fêmeas, apresentaram melhor desempenho na memória de habituação. Li e colaboraboradores[269] avaliaram os benefícios do ω-3 no comportamento de animais submetidos a ativação imune materna, os resultados demostraram que a dieta enriquecida com ω-3 demonstrou aliviar os sintomas comportamentais semelhantes ao TEA. Esses resultados provavelmente estejam relacionados a capacidade do ω-3 de regular a neuroinflamação, a atividade de microglial e a plasticidade sináptica no SNC em desenvolvimento[269].

Canever e colaboradores[286] avaliaram os efeitos neuroprotetores da suplementação com AF na gestação e lactação sobre os parâmetros comportamentais e bioquímicos em modelo animal de esquizofrenia. Os animais submetidos a uma dieta deficiente de AF e suplementadas com AF, apresentaram prejuízo nos testes de interação social e na memória de campo aberto, além de dano aos lipídios e as proteínas, e aumento das enzimas SOD e CAT. A suplementação com AF foi capaz de prevenir o dano aos lipídios e as proteínas, bem como de melhor desempenho nos testes comportamentais. Além de prevenir o dano cognitivo, a suplementação durante a gestação e lactação possui papel importante prevenindo o estresse oxidativo. Os benefícios da suplementação materna com AF, podem estar relacionados ao mecanismo da metilação do DNA, beneficiando o neurodesenvolvimento na prole[287]. Em humanos, a suplementação materna com AF está associada a uma melhora na capacidade verbal e motora em crianças[288], melhora da capacidade de armazenamento, na memória e no desempenho cognitivo[289–292].

Com relação aos resultados do teste de memória de reconhecimentos de objetos, foi possível observar um prejuízo na memória de longo prazo tanto na prole de machos e quanto na prole de fêmeas expostas ao LPS prenatalmente. A memória de reconhecimento é utilizada para avaliar o desempenho cognitivo, usado para análise de memória declarativa com poucas exposições ao material a ser aprendido[293]. Sabe-se que os pacientes autistas podem possuir algum nível de deficiência intelectual, de acordo com o nível de gravidade do transtorno[294]. Wischhof e colaboradores[295] demonstraram em um estudo pré-clínico que após a exposição ao LPS, animais machos e fêmeas apresentaram um comprometimento da memória, sendo mais grave nos machos. Corroborando, Howland e colaboradores[296] encontraram comprometimento da memória de reconhecimento de objetos em animais machos e fêmeas expostos ao Poly-IC, além de prejuízo no comportamento motor. Resultados semelhantes foram encontrados por Jenkins e colaboradores[297], que sugeriram que o comprometimento na tarefa de reconhecimento de objetos possa estar relacionada com a vulnerabilidade do córtex pré-frontal após o insulto imune pré-natal, ou ainda por alterações fisiopatológicas nas sub-regiões CA1-CA3 no hipocampo dos animais.

O hipocampo é uma estrutura importante na aprendizagem e memória[293,298]. A exposição ao LPS demonstra causar uma redução na densidade sináptica e diminuição de células neurais nesta estrutura[295]. Além de alterações em sistemas

neurotransmissores como serotonina, catecolaminas e acetilcolina que podem estar envolvidos nos déficits de memória encontrados neste estudo e em outros que utilizaram protocolos semelhantes[293,298].

No TEA o estresse oxidativo possui um importante fator na sua etiologia[134,270]. Regiões encefálicas como hipocampo, cerebelo e córtex frontal ocorrem aumento nos níveis de estresse oxidativo[134,270]. O estresse oxidativo leva ao comprometimento das defesas antioxidantes e atingem diversas moléculas alvo como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, tendo um importante papel na progressão de doenças[299]. Marcadores biológicos para medir os danos causados pela oxidação são a concentração de MDA e o dano a proteínas do grupamento carbonil[299], ambos avaliados.

Neste estudo, os resultados demostraram que nos animais machos expostos ao LPS tiveram um aumento significativo na concentração de MDA em cerebelo e córtex pré-frontal quando expostos ao LPS prenatalmente. Estudos realizados anteriormente[300,301] demonstram que a ativação imune materna é capaz de produzir dano oxidativo a lipídios e proteínas, esses resultados podem estar relacionados ao acúmulo de peróxido de hidrogênio nas estruturas encefálicas analisadas. A suplementação isolada de AF e a suplementação associada de ω-3+AF diminuíram a concentração de MDA no hipocampo dos machos e no cerebelo e córtex pré-frontal das fêmeas. Além disso, a suplementação associada de ω-3+AF diminuiu os níveis das proteínas carboniladas no córtex pré-frontal dos machos. Desta forma, sugere-se que a suplementação com ω-3 e AF associado e AF isolado, foi capaz de promover uma diminuição no dano oxidativo as proteínas no córtex pré-frontal da prole de animais machos.

Corroborando com os achados deste estudo, Réus e colaboradores[302] demonstraram que suplementação com ω-3 e AF diminuiu os níveis de carbonilação de proteínas e preveniu contra a peroxidação lipídica em animais submetidos a um protocolo de estresse precoce. Sable e colaboradores[218] avaliaram os benefícios da suplementação materna com ω-3 em uma dieta deficiente ou em excesso de AF materno. A dieta deficiente de AF diminuiu os níveis de DHA no córtex pré-frontal e de fator neurotrófico derivado do cérebro (BNDF) no hipocampo, além provocar prejuízo cognitivo nos animais. No entanto, nos animais suplementados com ω-3 os níveis de BNDF foram revertidos. Labrousse e colaboradores[303] demonstraram que deficiência de ω-3 em animais expostos ao LPS alterou os níveis da composição

lipídica cerebral sendo capaz de aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias no SNC da prole e da mãe, além de induzir déficits comportamentais. Os resultados deste estudos somados, permitem sugerir que níveis maternos adequados de ω-3 são importantes para o desenvolvimento do SNC fetal, visto que o DHA é transferido para a prole durante a gestação e lactação.

Zhou e colaboradores[304] examinaram amostras de soro de 40 crianças autistas para avaliação da concentração sérica de anticorpos receptores de folato. Os resultados demonstraram que, nestas crianças, o AF não é absorvido de maneira correta, podendo estar relacionado a etiologia da doença. O AF e DHA são importantes moduladores das funções neurais, no entanto, o desequilíbrio destes acarreta no aumento de estresse oxidativo através da geração de radicais livres que interagem com os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas ou lipoproteínas. As EROs atacam as ligações duplas dos ácidos graxos nas membranas e iniciam uma reação em cascata gerando a peroxidação lipídica[217].

O AF e ω-3 possuem efeitos independentes no crescimento fetal. Porém, o AF tem a capacidade de alterar o metabolismo dos ácidos graxos[305] pois está envolvido no metabolismo de um carbono, que é responsável pela regulação do estresse oxidativo e na metilação da cromatina[306]. O metabolismo de um carbono alterado promove alterações nos níveis de homocisteína e também regula os níveis dos fosfolípidos das membranas, como o DHA[217,307], além disso, atua na síntese de lipídios e proteínas[308]. Portanto, a deficiência materna desses nutrientes nos períodos críticos do desenvolvimento cerebral pode estar associada a um comprometimento nos sistemas neurotransmissores, redução da produção de mielina, alterações no número de células e nas sinapses nervosas[309]. Estruturas específicas, como o hipocampo e o cerebelo são mais vulneráveis aos efeitos da má nutrição materna[310] e esses déficits nutricionais podem estar relacionados a déficits cognitivos e a transtornos neurológicos, incluindo o TEA[310,311].

As diferenças comportamentais e bioquímicas entre machos e fêmeas encontradas neste estudo, sugerem que a ativação imunológica neonatal produza respostas diferentes em cada um dos sexos. As fêmeas possuem uma maior resistência a infecção em relação aos machos, sendo assim, são menos susceptíveis aos desafios do sistema imunológico no início da vida[312]. Podendo estas diferenças estarem relacionadas as ações imunomoduladoras dos hormônios sexuais. Frente a uma infecção bacteriana ou viral, a testosterona deprime a imunidade humoral. Desta

forma, a exposição a um insulto inflamatório em machos pode acarretar, de forma mais importante, alterações na função da micróglia, alterando o desenvolvimento neural, com isso o desenvolvimento de doenças neurológicas[313]. Além disso, os hormônios femininos, especificamente o estrógeno, exercem efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores[314,315].

Embora os mecanismos pelos quais as diferenças sexuais estão envolvidas no desenvolvimento da doença não estejam bem estabelecidos, os achados deste estudo reforçam a maior prevalência da taxa de diagnósticos de TEA no sexo masculino em relação ao sexo feminino, numa proporção de 4 meninos autistas para cada menina[316]. Um estudo realizado por Evans e colaboradores[317] avaliou as diferenças nos sintomas autistas de meninos e meninas com idade entre 8 a 10 anos. As meninas apresentaram menor comprometimento na comunicação, na interação social e no comportamento estereotipado em comparação aos meninos. Esses resultados são dependentes do *status* de cada paciente. Em geral, o sexo masculino apresenta maior agressividade e comportamento repetitivo na infância, e no sexo feminino os sintomas são marcantes na adolescência ou fase adulta[318,319]. Além disso, as mulheres não exibem o isolamento social tanto quanto os homens[320].

Por fim, as mudanças comportamentais encontradas neste estudo após a exposição pré-natal ao LPS foram capazes de promover alterações distintas de acordo com o gênero, considerando a prole de machos e fêmeas. A suplementação materna com ω-3 e AF, associados ou isolados, pode estar associada a melhora no prejuízo da interação social, diminuição de episódios de *grooming*, melhora na memória de habituação, além da diminuição na concentração de MDA e diminuição nos níveis das proteínas carboniladas. Estes resultados sugerem que a suplementação materna com ω-3 e AF, associados ou isolados, possam representar potenciais mecanismos neuroprotetores para o tratamento do TEA.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados deste estudo, conclui-se que a exposição pré-natal ao LPS foi capaz de promover na prole de machos e fêmeas alterações comportamentais e neuroquímicas distintas semelhantes aquelas observadas nos indivíduos com TEA que incluem:

- prejuízos nos parâmetros de interação social na prole de animais machos e fêmeas;
- prejuízo na memória de habituação em campo aberto na prole de animais fêmeas;
- prejuízo na memória de longa duração na prole de animais machos e fêmeas;
- aumento na concentração de MDA em cerebelo e córtex pré-frontal na prole de animais machos;
- a suplementação materna com ω-3 e AF isoladamente ou de forma associada apresentou na prole de machos e fêmeas melhora do comportamento tipo autista e exerceu efeito neuroprotetor nos seguintes parâmetros:
  - ✓ melhora no prejuízo da interação social tanto em animais machos quanto em fêmeas;
  - ✓ diminuição de episódios de *grooming* na prole de animais machos;
  - ✓ melhora na memória de habituação na prole de animais fêmeas;
  - ✓ diminuição na concentração de MDA hipocampo da prole de animais machos e no cerebelo e córtex pré-frontal na prole de animais fêmeas;
  - ✓ diminuição nos níveis das proteínas carboniladas no córtex pré-frontal da prole de animais machos.

No entanto, mesmo que a suplementação materna com ω-3 e AF, isolados ou associados, tenham apresentados efeitos positivos tanto comportamentais como bioquímicos no modelo animal de TEA, novos estudos e outros protocolos de suplementação materna são necessários para confirmação de seus potenciais efeitos protetores e como alternativa terapêutica na prevenção ou no tratamento das

condições clínicas associadas ao TEA, tanto em modelos pré-clínicos, quanto futuramente na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Lindsay KL, Buss C, Wadhwa PD, Entringer S. The Interplay between Maternal Nutrition and Stress during Pregnancy: Issues and Considerations. Ann Nutr Metab. 2017;70(3):191–200.

2. Estes ML, Mcallister AK. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. Science (80). 2017;353(6301):772–7.

3. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-V. 5 ed. Washington: American Psychiatric Association; 2013.

4. Ministério da Saúde (Brasil). Classificação de transtornos menstais e de comportamento da CID-10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993.

5. Pasciuto E, Borrie SC, Kanellopoulos AK, Santos AR, Cappuyns E, D'Andrea L, et al. Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. Neurobiol Learn Mem. 2015;124:71–87.

6. Parellada M, Penzol MJ, Pina L, Moreno C, González-Vioque E, Zalsman G, et al. The neurobiology of autism spectrum disorders. Eur Psychiatry. 2014;29(1):11–9.

7. Holmboe K, Rijsdijk FV, Hallett V, Happé F, Plomin R, Ronald A. Strong genetic influences on the stability of autistic traits in childhood. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2014;53(2):221–30.

8. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. Ann Neurol. 2005;57(1):67–81.

9. Depino AM. Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. Mol Cell Neurosci. 2013;53:69–76.

10. Currenti SA. Understanding and determining the etiology of autism. Cell Mol Neurobiol. 2010;30(2):161–71.

11. Gesundheit B, Rosenzweig JP, Naor D, Lerer B, Zachor DA, Procházka V, et al. Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. J Autoimmun. 2013;44:1–7.

12. Kumar K, Kumar S. Role of nutraceuticals in health and disease prevention: A review Classification of Nutraceuticals. South Asian J. Food Technol. Environ. 2015;1(2):116–21.

13. Nasri H, Baradaran A, Shirzad H, Mahmoud Rafieian-Kopaei. New Concepts in Nutraceuticals as Alternative for Pharmaceuticals. Int J Prev Med.

2014;5(12):1487–99.

14. Hoeijmakers L, Lucassen PJ, Korosi A. The interplay of early-life stress, nutrition and immune activation programs adult hippocampal structure and function. Front Mol Neurosci. 2015;7:1–16.

15. Cusick S, Georgieff M. The role of nutrition in brain development: The golden ppportunity of the “first 1000 days.” J Pediatr Psychol. 2016;(175):16–21.

16. Morse NL. Benefits of docosahexaenoic acid, folic acid, vitamin D and iodine on foetal and infant brain development and function following maternal supplementation during pregnancy and lactation. Nutrients. 2012;4(7):799–840.

17. Trépanier MO, Hopperton KE, Orr SK, Bazinet RP. N-3 polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation: An update. Eur J Pharmacol. 2016;785:187–206.

18. Su K-P, Matsuoka Y, Pae C-U. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Prevention of Mood and Anxiety Disorders. Clin Psychopharmacol Neurosci. 2015;13(2):129–37.

19. Van De Rest O, Van Hooijdonk LWA, Doets E, Schiepers OJG, Eilander A, Groot LCPGM. B vitamins and n-3 fatty acids for brain development and function: Review of human studies. Ann Nutr Metab. 2012;60(4):272–92.

20. Mello AH, Gassenferth A, Schraiber RB, Souza LR, Florentino D, Danielski LG, et al. Effects of omega-3 on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to chronic mild stress. Metab Brain Dis. 2014;29(3):691–9.

21. Mita T, Mayanagi T, Ichijo H, Fukumoto K, Otsuka K, Sakai A, et al. Docosahexaenoic acid promotes axon outgrowth by translational regulation of tau and collapsin response mediator protein 2 expression. J Biol Chem. 2016;291(10):4955–65.

22. Elsherbiny ME, Goruk S, Monckton EA, Richard C, Brun M, Emara M, et al. Long-term effect of docosahexaenoic acid feeding on lipid composition and brain fatty acid-binding protein expression in rats. Nutrients. 2015;7(10):8802–17.

23. Yurko-Mauro K, Alexander DD, Van Elswyk ME. Docosahexaenoic acid and adult memory: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2015;10(3):1–18.

24. Desai A, Sequeira JM, Quadros E V. The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. Biochimie. 2016;126:31–42.

25. Kennedy DO. B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—A review. Nutrients. 2016;8(2).

26. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. Neuropsychol Rev. 2010;20(4):327–48.

27. Rane P, Cochran D, Hodge SM, Haselgrove C, Kennedy D, Frazier JA. Connectivity in autism: a review of MRI connectivity studies. Harv Rev Psychiatry. 2015;23(4):223–44.

28. Fox SE, Levitt P, Nelson CA. How the Timing and Quality of Early Experiences Influence the Development of Brain Architecture. Child Dev. 2010;81(1):28–40.

29. Levitt P. Structural and functional maturation of the developing primate brain. J Pediatr. 2003;143(4):35–45.

30. Cowan W. The development of the brain. Sci Am. 1979;241(3):113–33.

31. Kostovic I. Laminar Organization of the Human Fetal Cerebrum Revealed by Histochemical Markers and Magnetic Resonance Imaging. Cereb Cortex. 2002;12(5):536–44.

32. Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. J Comp Neurol. 1997;387(2):167–78.

33. Becker LE, Armstrong DL, Chan F, Wood MM. Development in Human Occipital Cortical Neurons. Dev Brain Res. 1984;13:117–24.

34. Rice D, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. Environ Health Perspect. 2000;108(SUPPL. 3):511–33.

35. Field T, Diego M, Hernandez-Reif M, Figueiredo B, Deeds O, Ascencio A, et al. Prenatal dopamine and neonatal behavior and biochemistry. Infant Behav Dev. 2008;31(4):590–3.

36. Xiong F, Zhang L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. Front Neuroendocrinol. 2013;34(1):27–46.

37. Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. Nat Rev Neurol. 2014;10(11):643–60.

38. Weber-Stadlbauer U, Richetto J, Labouesse MA, Bohacek J, Mansuy IM, Meyer U. Transgenerational transmission and modification of pathological traits induced by prenatal immune activation. Mol Psychiatry. 2017;22(1):102–12.

39. Meyer U. Prenatal Poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. Biol Psychiatry. 2014;75(4):307–15.

40. Wang X, Hagberg H, Zhu C, Jacobsson B, Mallard C. Effects of intrauterine inflammation on the developing mouse brain. Brain Res. 2007;1144(1):180–5.

41. Brown AS. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. Dev Neurobiol. 2012;72(10):1272–6.

42. Batinić B, Santrač A, Divović B, Timić T, Stanković T, Obradović AL, et al. Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. Behav Brain Res. 2016;299:72–80.

43. Theoharides TC, Asadi S, Patel AB. Focal brain inflammation and autism. J Neuroinflammation. 2013;10(46):1–7.

44. Vorhees C V., Graham DL, Braun AA, Schaefer TL, Skelton MR, Richtand NM, et al. Prenatal immune challenge in rats: Effects of polyinosinic- polycytidylic acid on spatial learning, prepulse inhibition, conditioned fear, and responses to MK-801 and amphetamine. Neurotoxicol Teratol. 2015;47:54–65.

45. Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. Neuroimmunomodulation. 2010;17(4):240–51.

46. Patterson PH. Maternal infection and immune involvement in autism. Trends Mol Med. 2011;17(7):389–94.

47. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. Nat Rev Neurosci. 2010;11(7):490–502.

48. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. Annu Rev Biochem. 2002;71:635–700.

49. Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: Implications for schizophrenia. Mol Psychiatry. 2006;11(1):47–55.

50. Kinoshita D, Cohn DWH, Costa-Pinto FA, Sá-Rocha LC. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. Physiol Behav. 2009;96(2):328–32.

51. Dunn AJ. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. Clin Neurosci Res. 2006;6(1–2):52–68.

52. Saluk-Juszczak J, B. Wachowicz. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. Postep Biochem. 2005;51(3):280–7.

53. Choi GB, Yim Y, Wong H, Kim S, Kim H, Kim S V., et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autismlike phenotypes in offspring. Science (80). 2016;351(6276):933–9.

54. Jung M, Tu Y, Lang CA, Ortiz A, Park J, Jorgenson K, et al. Decreased structural connectivity and resting-state brain activity in the lateral occipital

cortex is associated with social communication deficits in boys with autism spectrum disorder. Neuroimage. 2017;(April):1–8.

55. Evans B. How autism became autism: The radical transformation of a central concept of child development in Britain. Hist Human Sci. 2013;26(3):3–31.

56. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. Acta Paedopsychiatr. 1968;35(4):100–36.

57. Kanner L. Problems of nosology and psychodynamics of early infantile autism. Am J Orthopsychiatry. 1949;19(3):416–26.

58. Asperger H. Die autistichen psychopathen im kindersalter. Archly fiur Psychiatr und Nervenkrankheiten. 1944;117:76–136.

59. Verhoeff B. The autism puzzle: Challenging a mechanistic model on conceptual and historical grounds. Philos Ethics Humanit Med. 2013;8(1):1.

60. Verhoeff B. Autism in flux: A history of the concept from Leo Kanner to DSM-5. Hist Psychiatry. 2013;24(4):442–58.

61. American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-III-R). 3 ed. São Paulo: Manole; 1989.

62. Prevalence of Autism Spectrum Disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States [Internet]. 2008. Acesso em 10/07/2018. Disponível em: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6103a1.htm.

63. Zablotsky B, Black LI, Maenner MJ, Schieve LA. Estimated prevalence of Autism and other developmental disabilities following questionnaire changes in the 2014 National Health Interview Survey. Natl Health Stat Report. 2015;(87):1–21.

64. Finer S, Khan KS, Hitman GA, Griffiths C, Martineau A, Meads C. Inadequate vitamin D status in pregnancy: Evidence for supplementation. Acta Obstet Gynecol Scand. 2012;91(2):159–63.

65. Christensen D, Baio J, Braun KVN, Blider D, Charles J, Constantino J, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years-Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. MMWR Surveill Summ. 2016;65(3):1–23.

66. Paula CS, Ribeiro SH, Fombonne E, Mercadante MT. Brief report: Prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: A pilot study. J Autism Dev Disord. 2011;41(12):1738–42.

67. Teixeira M, Meca T, Velloso R, Ribeiro S, Mercadante M, CS Paula. Brazilian scientific production about Autism Spectrum Disorders. Rev Assoc Med Bras. 2010;56:1–8.

68. Samsam M, Ahangari R, Naser SA. Pathophysiology of autism spectrum disorders: Revisiting gastrointestinal involvement and immune imbalance. World J Gastroenterol. 2014;20(29):9942–51.

69. McCarthy MM, Wright CL. Convergence of sex differences and the neuroimmune system in Autism Spectrum Disorders. Biol Psychiatry. 2017;81(5):402–10.

70. Jones RM, Lord C. Diagnosing autism in neurobiological research studies Rebecca. Behav Brain Res. 2013;15(251):113–24.

71. Schieve LA, Rice C, Yeargin-Allsopp M, Boyle CA, Kogan MD, Drews C, et al. Parent-reported prevalence of autism spectrum disorders in US-born children: An assessment of changes within birth cohorts from the 2003 to the 2007 national survey of children's health. Matern Child Health J. 2012;16(Suppl. 1):151–7.

72. Miles JH. Autism spectrum disorders-A genetics review. Genet Med. 2011;13(4):278–94.

73. Berg JM, Geschwind DH. Autism genetics: searching for speci city and convergence. Genome Biol. 2012;13(247):1–16.

74. Froehlich-santino W, Tobon AL, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, et al. Prenatal and Perinatal Risk Factors in a Twin Study of Autism Spectrum Disorders. J Psychiatr Res. 2014;54:100–8.

75. Hegazy HG, Ali EHA, Elgoly AHM. Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: Evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model. Cytokine. 2015;71(2):173–80.

76. Siddiqui MF, Elwell C, Johnson MH. Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. Autism Open Access. 2016;6(5):1–12.

77. Chen S, Zhong X, Jiang L, Zheng X, Xiong Y, Ma S, et al. Maternal autoimmune diseases and the risk of autism spectrum disorders in offspring: A systematic review and meta-analysis. Behav Brain Res. 2016;296:61–9.

78. Wu S, Ding Y, Wu F, Li R, Xie G, Hou J, et al. Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: A systematic review and meta-analysis. Neurosci Biobehav Rev. 2015;55:322–32.

79. Edmiston E, Ashwood P, Water JV. Autoimmunity, autoantibodies and autism spectrum disorders (ASD). Biol Psychiatry. 2017;18(3):383–90.

80. Dalton P, Deacon R, Blamire A, Pike M, McKinlay I, Stein J, et al. Maternal neuronal antibodies associated with autism and a language disorder. Ann Neurol. 2003;53(4):533–7.

81. Chen JA, Peñagarikano O, Belgard TG, Swarup V, Geschwind DH. The Emerging Picture of Autism Spectrum Disorder: Genetics and Pathology. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2015;10(1):111–44.

82. Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. Brain Behav Immun. 2012;26(3):383–92.

83. Krakowiak P, Goines PE, Tancredi DJ, Ashwood P, Hansen RL, Hertz-Picciotto I, et al. Neonatal cytokine profiles associated with autism spectrum disorder. Biol Psychiatry. 2016;179(11 0):95–105.

84. Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. Acta Psychiatr Scand. 2017;135(1):29–41.

85. Wang Y, Tang S, Xu S, Weng S, Liu Z. Maternal body mass index and risk of autism spectrum disorders in offspring: A meta-analysis. Sci Rep. 2016;6:1–8.

86. Edlow AG, Vora NL, Hui L, Wick HC, Cowan JM, Bianchi DW. Maternal obesity affects fetal neurodevelopmental and metabolic gene expression: A pilot study. PLoS One. 2014;9(2).

87. Parner ET, Baron-Cohen S, Lauritsen MB, Jorgensen M, Schieve LA, Yeargin-Allsopp M, et al. Parental Age and Autism Spectrum Disorders. Ann Epidemiol. 2012;22(3):143–50.

88. Ozonoff S, Young G, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: A baby siblings research consortium study. Pediatrics. 2011;128(3):e488–95.

89. Yenkoyan K, Grigoryan A, Fereshetyan K, Yepremyan D. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. Behav Brain Res. 2017;331(April):92–101.

90. Jiang L, Hou XH, Yang N, Yang Z, Zuo XN. Examination of local functional homogeneity in autism. Biomed Res Int. 2015;2015:12–4.

91. Santangelo SL, Tsatsanis K. What is known about autism: genes, brain, and behavior. Am J Pharmacogenomics. 2005;5(2):71–92.

92. Hazlett HC, Gu H, Munsell BC, Hyung S, Styner M, Wolff JJ, et al. Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. Nature. 2017;542(7641):348–51.

93. Lundwall RA, Stephenson KG, Neeley-Tass ES, Cox JC, South M, Bigler ED, et al. Relationship between brain stem volume and aggression in children diagnosed with autism spectrum disorder. Res Autism Spectr Disord. 2017;34:44–51.

94. Jaiswal P, Mohanakumar KP, Rajamma U. Serotonin mediated

immunoregulation and neural functions: Complicity in the aetiology of autism spectrum disorders. Neurosci Biobehav Rev. 2015;55:413–31.

95. Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Futatsubashi M, Yoshihara Y, et al. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. Jama Psychiatry. 2013;70(1):49–58.

96. Cao F, Yin A, Wen G, Sheikh AM, Tauqeer Z, Malik M, et al. Alteration of astrocytes and Wnt/β-catenin signaling in the frontal cortex of autistic subjects. J Neuroinflammation. 2012;9:1–11.

97. Schwarz JM, Bilbo SD. Sex, Glia and Development: interactions in health and disease. Horm Behav. 2012;62(3):243–53.

98. Feng C, Chen Y, Pan J, Yang A, Niu L, Min J, et al. Redox proteomic identification of carbonylated proteins in autism plasma: Insight into oxidative stress and its related biomarkers in autism. Clin Proteomics. 2017;14(1):1–8.

99. Venkataraman A, Duncan JS, Yang DYJ, Pelphrey KA. An unbiased Bayesian approach to functional connectomics implicates social-communication networks in autism. NeuroImage Clin. 2015;8:356–66.

100. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. Neuroinflammation in autism spectrum disorders. J Neuroinflammation. 2012;9(1):1.

101. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, McGinnis W, Koibuchi N. Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD). Cerebellum. 2011;10(1):43–8.

102. Halliwell B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? Trends Pharmacol Sci. 2011;32(3):125–30.

103. Efe H, Deger O, Kirci D, Karahan SC, Örem A, Calapoglu M. Decreased neutrophil antioxidative enzyme activities and increased lipid peroxidation in hyperlipoproteinemic human subjects. Clin Chim Acta. 1999;279(1–2):155–65.

104. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: The interplay. Biomed Res Int. 2014;2014.

105. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2011;25(3):287–99.

106. Aprioku JS. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. J Reprod Infertil. 2013;14(4):158–72.

107. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev Nutr. 2010;23(4):629–43.

108. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev Nutr. 1999;12(2):123–30.

109. Prasad AS, Beck FWJ, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: Effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. Am J Clin Nutr. 2007;85(3):837–44.

110. Halliwell B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. Ann Rheum Dis. 1995;54(6):505–10.

111. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Medicina. 1997;43(1):61–8.

112. Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. Free Radic Biol Med. 2002;32(7):577–83.

113. Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. Free Radic Biol Med. 2011;51(7):1302–19.

114. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? J Neurochem. 2006;97(6):1634–58.

115. Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013;46:214–23.

116. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in alzheimer's disease. Neurology. 1995;45(8):1594–601.

117. Luo S, Wehr NB. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. Redox Rep. 2009;14(4):159–66.

118. Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. Biochim Biophys Acta. 2001;1504(2–3):196–219.

119. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman E. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. Free Radic Res. 2000;33(Suppl.S):99–108.

120. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta. 2003;329(1–2):23–38.

121. Andreazza AC. Combining redox-proteomics and epigenomics to explain the involvement of oxidative stress in psychiatric disorders. Mol Biosyst. 2012;8(10):2503–12.

122. Dismutases S, Fridovich I. Superoxide Anion Radical (O2), Superoxide

Dismutases and Related Matters. J Biol Chem. 1997;272(30):18515–7.

123. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev. 1994;74(1):139–62.

124. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage As A Therapeutic Strategy in Diabetes. Diabetes. 2004;53(Suppl. 1):s110–8.

125. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways and targets for early therapeutic intervention. Exp Neurol. 2007;208(1):1–25.

126. Prakash PA, Yogeswaran U, Chen SM. A review on direct electrochemistry of catalase for electrochemical sensors. Sensors. 2009;9(3):1821–44.

127. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of Its activity in different diseases. Folia Biol. 2014;60(4):153–67.

128. Bekdeşer B, Özyürek M, Güçlü K, Alkan FÜ, Apak R. Development of a new catalase activity assay for biological samples using optical CUPRAC sensor. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. 2014;132:485–90.

129. Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(2):C670-86.

130. Perry SW, Norman JP, Litzburg A, Gelbard HA. Antioxidants are required during the early critical period, but not later, for neuronal survival. J Neurosci Res. 2004;78(4):485–92.

131. Nunomura A, Tamaoki T, Motoshashi N. Role of oxidative stress in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Seishin Shinkeigaku Zasshi. 2014;116(10):842–58.

132. Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. Pathophysiology. 2006;13(3):171–81.

133. Salim S. Oxidative Stress and Psychological Disorders. Curr Neuropharmacol. 2014;12(2):140–7.

134. López-Hurtado E, Prieto JJ. A microscopic study of language-related cortex in autism. Am J Biochem Biotechnol. 2008;4(2):130–45.

135. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin - The antioxidant proteins. Life Sci. 2004;75(21):2539–49.

136. Adams JB, Audhya T, McDonough-Means S, Rubin RA, Quig D, Geis E, et al. Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children

and the association with autism severity. Nutr Metab. 2011;8(34):1–32.

137. Wang L, Jia J, Zhang J, Li K. Serum levels of SOD and risk of autism spectrum disorder: A case-control study. Int J Dev Neurosci. 2016;51:12–6.

138. Cortelazzo A, Felice C, Guerranti R, Signorini C, Leoncini S, Zollo G, et al. Expression and oxidative modifications of plasma proteins in autism spectrum disorders: Interplay between inflammatory response and lipid peroxidation. Proteomics Clin Appl. 2016;10(11):1103–12.

139. Loeffler DA, Connor tJ R, Juneau PL, Snyder tB S, Kanaley L, DeMaggio AJ, et al. Transferrin and Iron in Normal, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease Brain Regions. J Neurochem Lippincott-Raven Publ Philadelphia J Neurochem. 1995;65:710–6.

140. Arnaud P, Gianazza E, Miribel L. Ceruloplasmin. Methods Enzym. 1988;163:441–52.

141. Gutterridge J, Richmond R, Halliwell B. Oxigênio radicais livres e peroxidação lipídica. A inibição pela proteína de ceruloplasmina. FEBS Lett. 1980;269–72.

142. McCord JM, Day ED. Superoxide-dependent production of hydroxyl by iron-EDTA complex. FEBS Lett. 1978;86(1):139–42.

143. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Adv Med Sci. 2018;63(1):68–78.

144. Vianna MR, Izquierdo L a, Barros DM, Walz R, Medina JH, Izquierdo I. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. An Acad Bras Cienc. 2000;72:353–64.

145. Kessels RPC, Haan EHF. Implicit Learning in Memory Rehabilitation: A Meta-Analysis on Errorless Learning and Vanishing Cues Methods. J Clin Exp Neuropsychol. 2003;25(6):805–14.

146. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. Neurobiol Learn Mem. 1997;68(3):285–316.

147. Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. Behav Brain Res. 1999;103:1–11.

148. Morgane P, Mokler D, Galler J. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. Neurosci Biobehav Rev. 2002;26(4):471–83.

149. Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. Trends Neurosci. 2006;29(9):496–505.

150. Sandrini M, Censor N, Mishoe J, Cohen LG. Causal Role of Prefrontal Cortex

in Strengthening of Episodic Memories through Reconsolidation. Curr Biol. 2013;23(21):2181–4.

151. Crystal JD. Episodic-like memory in animals. Behav Brain Res. 2010;215(2):235–43.

152. Schuchard J, Thompson CK. Implicit and Explicit Learning in Individuals with Agrammatic Aphasia. J Psycholinguist Res. 2014;43(3):209–24.

153. Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Reconsolidation and the fate of consolidated memories. Neurotox Res. 2008;14(4):353–8.

154. Rosenzweig MR, Bennett EL, Colombo PJ, Lee DW, Serrano PA. Short-term, intermediate-term, and long-term memories. Behav Brain Res. 1993;57(2):193–8.

155. Quevedo J, Sant' Anna MK, Madruga M, Lovato I, De-Paris F, Kapczinski F, et al. Differential effects of emotional arousal in short and long-term memory in healthy adults. Neurobiol Learn Mem. 2003;79(2):132–5.

156. Izquierdo I, Barros DM, Souza TM, Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. Nature. 1998 Jun;393(6686):635–6.

157. Geurts HM, Vissers ME. Elderly with autism: Executive functions and memory. J Autism Dev Disord. 2012;42(5):665–75.

158. Sinzig J, Morsch D, Bruning N, Schmidt MH, Lehmkuhl G. Inhibition, flexibility, working memory and planning in autism spectrum disorders with and without comorbid ADHD-symptoms. Child Adolesc Psychiatry Ment Health. 2008;2:1–12.

159. Geurts HM, Verte S, Oosterlaan J, Roeyers H, Sergeant JA, Verté S, et al. How specific are executive functioning deficits in attention deficit hyperactivity disorder and autism? J Child Psychol Psychiatry. 2004;45(4):836–54.

160. Gharami K, Das M, Das S. Essential role of docosahexaenoic acid towards development of a smarter brain. Neurochem Int. 2015;89:51–62.

161. Shooshtari MK, Moazedi AA, Parham GA. Memory and motor coordination improvement by folic acid supplementation in healthy adult male rats. Iran J Basic Med Sci. 2012;15(6):1173–9.

162. Chaturvedi S, Sharma PK, Garg VK, Bansal M. Role of nutraceuticals in health promotion. Int J PharmTech Res. 2011;3(1):442–8.

163. Kalra EK. Nutraceutical-definition and introduction. AAPS PharmSci. 2003;5(3):27–8.

164. Cooper JK. Nutrition and the brain: What advice should we give? Neurobiol Aging. 2014;35(Suppl.2):S79–83.

165. Sharma V, Singh L, Verma N, Kalra G. The Nutraceutical Amino Acids - Nature's Fortification for Robust Health. Br J Pharm Res. 2016;11(3):1–20.

166. Hang L, Basil AH, Lim KL. Nutraceuticals in Parkinson's Disease. NeuroMolecular Med. 2016;18(3):306–21.

167. Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. Molecules. 2015;15(11):7792–814.

168. Rathod R, Kale A, Joshi S. Novel insights into the effect of vitamin B12 and omega-3 fatty acids on brain function. J Biomed Sci. 2016;23(1):17.

169. Schmidt RJ, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schmidt LC, Tancredi DJ, Tassone F, Hertz-Picciotto I. Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. Epidemiology. 2012;22(4):476–85.

170. Haag M. Essential fatty acids and the brain. Can J Psychiatry. 2003;48(3):195–203.

171. Perini JÂL, Stevanato FB, Sargi SC, Visentainer JEL, Dalalio MMO, Matshushita M, et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: Metabolismo em mamíferos e resposta imune. Rev Nutr. 2010;23(6):1075–86.

172. James S, Montgomery P, Williams K. Omega-3 fatty acids supplementation for autism spectrum disorders (ASD). Cochrane Database Syst Rev. 2011;(11):1–36.

173. Conklin S, Runyan C, Leonard S. Age-related changes of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the anterior cingulate cortex of individuals with major depressive disorder. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2010;82(2–3):111–9.

174. Thomas J, Thomas CJ, Radcliffe J, Itsiopoulos C. Omega-3 Fatty Acids in Early Prevention of Inflammatory Neurodegenerative Disease: A Focus on Alzheimer's Disease. Biomed Res Int. 2015;2015.

175. Vaezi R, Napier JA, Sayanova O. Identification and functional characterization of genes encoding omega-3 polyunsaturated fatty acid biosynthetic activities from unicellular microalgae. Mar Drugs. 2013;11(12):5116–29.

176. Nahas R, Sheikh O. Complementary and alternative medicine for the treatment of major depressive disorder. Can Fam Physician. 2011;57(6):659–63.

177. Bos DJ, Oranje B, Veerhoek ES, Van Diepen RM, Weusten JMH, Demmelmair H, et al. Reduced Symptoms of Inattention after Dietary Omega-3 Fatty Acid Supplementation in Boys with and without Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. Neuropsychopharmacology. 2015;40(10):2298–306.

178. Mankad D, Dupuis A, Smile S, Roberts W, Brian J, Lui T, et al. A randomized, placebo controlled trial of omega-3 fatty acids in the treatment of young

children with autism. Mol Autism. 2015;6(1):1–11.

179. Madore C, Nadjar A, Delpech JC, Sere A, Aubert A, Portal C, et al. Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. Brain Behav Immun. 2014;41:22–31.

180. Takeuchi T, Fukumoto Y, Harada E. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. Behav Brain Res. 2002;131(1–2):193–203.

181. Strokin M, Sergeeva M, Reiser G. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca2+. Br J Pharmacol. 2003;139(5):1014–22.

182. Champeil-Potokar G, Chaumontet C, Guesnet P, Lavialle M, Denis I. Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes. Eur J Neurosci. 2006;24(11):3084–90.

183. Joardar A, Sen AK, Das S. Docosahexaenoic acid facilitates cell maturation and β-adrenergic transmission in astrocytes. J Lipid Res. 2006;47(3):571–81.

184. Sakayori N, Maekawa M, Numayama-Tsuruta K, Katura T, Moriya T, Osumi N. Distinctive effects of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on neural stem/progenitor cells. Genes to Cells. 2011;16(7):778–90.

185. Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. Brain Res. 2008;1237:35–43.

186. Lei E, Vacy K, Boon WC. Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. Neurochem Int. 2016;95:75–84.

187. Lozada LE, Desai A, Kevala K, Lee J-W, Kim H-Y. Perinatal Brain Docosahexaenoic Acid Concentration Has a Lasting Impact on Cognition in Mice. J Nutr. 2017;147(9):1–7.

188. Lee HJ, Han J, Jang Y, Kim SJ, Park JH, Seo KS, et al. Docosahexaenoic acid prevents paraquat-induced reactive oxygen species production in dopaminergic neurons via enhancement of glutathione homeostasis. Biochem Biophys Res Commun. 2015;457(1):95–100.

189. Hashimoto M, Hossain S. Neuroprotective and Ameliorative Actions of Polyunsaturated Fatty Acids Against Neuronal Diseases: Beneficial Effect of Docosahexaenoic Acid on Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. J Pharmacol Sci. 2011;116(2):150–62.

190. Kelly L, Grehan B, Chiesa A Della, O'Mara SM, Downer E, Sahyoun G, et al. The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the

hippocampus of the aged rat. Neurobiol Aging. 2011;32(12):2318.e1-2318.e15.

191. Lee YJ, Oh SH, Park C, Hong M, Lee AR, Yoo HJ, et al. Advanced pharmacotherapy evidenced by pathogenesis of autism spectrum disorder. Clin Psychopharmacol Neurosci. 2014;12(1):19–30.

192. Kang JX. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio in chronic diseases: animal models and molecular aspects. World Rev Nutr Diet. 2011;102:22–9.

193. Fortunato JJ, Rosa N, Laurentino AOM, Goulart M, Michalak C, Borges LP, et al. Effects of ω-3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccarides. Nutrition. 2017;35:119–27.

194. Khaire A, Rathod R, Kemse N, Kale A, Joshi S. Supplementation with omega-3 fatty acids during gestation and lactation to a vitamin B-12-deficient or -supplemented diet improves pregnancy outcome and metabolic variables in Wistar rats. Reprod Fertil Dev. 2015;27(2):341–50.

195. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. Relative abundance of short chain and polyunsaturated fatty acids in propionic acid-induced autistic features in rat pups as potential markers in autism. Lipids Health Dis. 2014;13(1):1–10.

196. Madore C, Leyrolle Q, Lacabanne C, Benmamar-Badel A, Joffre C, Nadjar A, et al. Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3 and Microbiota. Neural Plast. 2016;1–15.

197. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. Trends Neurosci. 2003;26(3):137–46.

198. Lamers Y. Indicators and methods for folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status assessment in humans. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011;14(5):445–54.

199. Bottiglieri T. Folate, Vitamin B12, and S-Adenosylmethionine. Psychiatr Clin North Am. 2013;36(1):1–13.

200. Liew S. Folic acid and diseases - supplement it or not? Rev Assoc Med Bras. 2016;62(1):90–100.

201. Coppen A, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. J Psychopharmacol. 2005;19(1):59–65.

202. Valera-Gran D, Hera MG, Navarrete-Muñoz EM, Fernandez-Somoano A, Tardón A, Julvez J, et al. Folic acid supplements during pregnancy and child psychomotor development after the first year of life. JAMA Pediatr. 2014;168(11):1–10.

203. Budni J, Romero A, Molz S, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Del Barrio L, et al. Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-

SY5Y cell line can be prevented by folic acid. Neuroscience. 2011;190:346–53.

204. Georgieff MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorties and measurement. Am J Clin Nutr. 2007;85(Supplement):614S–20S.

205. Kronenberg G, Colla M, Endres M. Folic Acid, Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disease. Curr Mol Med. 2009;9(3):315–23.

206. Ibrahim W, Tousson E, El-Masry T, Arafa N, Akela M. The effect of folic acid as an antioxidant on the hypothalamic monoamines in experimentally induced hypothyroid rat. Toxicol Ind Health. 2012;28(3):253–61.

207. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radic Biol Med. 2001;30(12):1390–9.

208. Sarna LK, Wu N, Wang P, Hwang S-Y, Siow YL, O K. Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. Can J Physiol Pharmacol. 2012;90(2):155–65.

209. Zhao M, Chen Y-H, Dong X-T, Zhou J, Chen X, Wang H, et al. Folic Acid Protects against Lipopolysaccharide-Induced Preterm Delivery and Intrauterine Growth Restriction through Its Anti-Inflammatory Effect in Mice. PLoS One. 2013;8(12):e82713.

210. Stanger O. Physiology of Folic Acid in Health and Disease. Curr Drug Metab. 2002;3(2):211–23.

211. Jägerstad M. Folic acid fortification prevents neural tube defects and may also reduce cancer risks. Acta Paediatr. 2012;101(10):1007–12.

212. Catena A, Mu JA, Torres-esp FJ, Mart C, Diaz-piedra C, Gil A, et al. Folate and long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation during pregnancy has long-term effects on the attention system of 8.5-y-old offspring: a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr. 2016;103:115–27.

213. Fujiwara T, Morisaki N, Honda Y, Sampei M, Tani Y. Chemicals, Nutrition and Autism Spectrum Disorder: A Mini-Review. Front Neurosci. 2016;10(174).

214. Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. Xenobiotica. 2014;44(5):480–8.

215. Pu D, Shen Y, Wu J. Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis. Autism Res. 2013;6(5):384–92.

216. Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, et al. Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. Am J Clin Nutr.

2012;96(1):80–9.

217. Roy S, Anvita K, Dangat K, Sable P, Asmita K, Joshi S. Maternal micronutrients (folic acid and vitamin B12) and omega 3 fatty acids: Implications for neurodevelopmental risk in the rat offspring. Brain Dev. 2012;34:64–71.

218. Sable P, Kale A, Joshi S. Prenatal omega 3 fatty acid supplementation to a micronutrient imbalanced diet protects brain neurotrophins in both the cortex and hippocampus in the adult rat offspring. Metabolism. 2013;62(11):1607–22.

219. James S, Melnyk S, Jernigan S, Cleves M, Halsted C, Wong D, et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. Neuropsychiatr Genet. 2006;141:947–56.

220. James S, Melnyk S, Jernigan S, Pavliv O, Trusty T, Lehman S, et al. A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism. Neuropsychiatr Genet. 2010;153B(6):1209–20.

221. Steegers-Theunissen R, Obermann-Borst S, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers E, et al. Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. PLoS One. 2009;4(11):1–5.

222. Geraghty A, Lindsay K, Alberdi G, McAuliffe F, Gibney E. Nutrition during pregnancy impacts offspring's epigenetic status-evidence from human and animal studies. Nutr Metab Insights. 2015;8(S1):41–7.

223. Brosnan J, Jacobs R, Stead L, Brosnan M. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. Acta Biochim Pol. 2004;51(2):405–13.

224. Kaluzna-Czaplinska J, Michalska M, Rynkowski J. Homocysteine level in urine of autistic and healthy children. Acta Biochim Pol. 2011;58(1):31–4.

225. Virk J, Liew Z, Olsen J, Nohr E, Catov J, RitZ B. Preconceptional and prenatal supplementary folic acid and multivitamin intake and autism spectrum disorders. Autism. 2016;20(6):710–8.

226. Ferraz A, Kiss A, Araujo R, Salles H, Naliwaiko K, Pamplona J. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2008;78(3):183–8.

227. Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, Oliveira MB, et al. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. Neuroscience. 2014;259:223–31.

228. Firat D, Kuntsal L, Sirin Y. Protective effects of prenatal administration of folic

acid on retinoic acid-induced cellular damages of Meckel's cartilage in rats. Tohoku J Exp Med. 2005;205(1):27–36.

229. Bienengräber V, Malek F, Möritz K, Fanghänel J, Gundlach K, Weingärtner J. Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study. Cleft Palate Craniofac J. 2017;38(4):393–8.

230. Cysneiros R, Ferrari D, Arida RM, Terra VC, Almeida GA, Cavalheiro EA, et al. Qualitative analysis of hippocampal plastic changes in rats with epilepsy supplemented with oral omega-3 fatty acids. Epilepsy Behav. 2010;17(1):33–8.

231. Held HE, Pilla R, Ciarlone GE, Landon CS, Dean JB. Female rats are more susceptible to central nervous system oxygen toxicity than male rats. Physiol Rep. 2014;2(4):1–9.

232. Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, MacFabe DF. Pre-and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. PLoS One. 2014;9(1):1–13.

233. Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. AJP Regul Integr Comp Physiol. 2007;293(2):R581–9.

234. Stump D, Nemec M, Parker G, Coder P, Sloter E, Varsho B. Significance, reliability and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. Developmental and Reproductive Toxicology. 2011. 229-301 p.

235. Battisti JJ, Shreffler CB, Uretsky NJ, Wallace LJ. NMDA antagonists block expression of sensitization of amphetamine- and apomorphine-induced stereotypy. Pharmacol Biochem Behav. 2000;67(2):241–6.

236. Berridge KC, Aldridge JW, Houchard KR, Zhuang X. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: A model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. BMC Biol. 2005;3(4):1–16.

237. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. Neuropsychopharmacology. 2005;30(1):80–9.

238. Cook P, Wallace M, Singer G. A reinterpretation of schedule-induced behaviors based on a systematic analysis of behavior. Neurosci Biobehav Rev. 1983;7(1):97–104.

239. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behav Brain Res. 1992;51(1):83–92.

240. Schrõder N, O'Dell S, Marshall J. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. Synapse. 2003;49(2):89–96.

241. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, et al. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. Brazilian J Med Biol Res. 2007;40(6):831–7.

242. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods Enzymol. 1990;186(C):421–31.

243. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, et al. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. Assay Repair Biol Damage. 1990;186:464–78.

244. Randall RJ, Lewis A. The folin by oliver. Readings. 1951;193(1):265–75.

245. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Brasil). Resolução Normativa nº 13 de 20 de setembro de 2013. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diário Oficial da União. 2013;187:5–12.

246. Crawley JN, Paylor R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. Horm Behav. 1997;31(3):197–211.

247. Ramel SE, Georgieff MK. Preterm nutrition and the brain. World Rev Nutr Diet. 2014;110:190–200.

248. Bronson SL, Bale TL. Prenatal stress-induced increases in placental inflammation and offspring hyperactivity are male-specific and ameliorated by maternal antiinflammatory treatment. Endocrinology. 2014;155(7):2635–46.

249. Cordeiro C, Tsimis M, Burd I. Infections and Brain Development. Obs Gynecol Surv. 2015;70(10):644–55.

250. Anderson GM. Autism Biomarkers: Challenges, Pitfalls and Possibilities. J Autism Dev Disord. 2015;45(4):1103–13.

251. Sharma SR, Gonda X, Tarazi FI. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. Pharmacol Ther. 2018;

252. Das UN. Folic acid and polyunsaturated fatty acids improve cognitive function and prevent depression, dementia, and Alzheimer's disease-But how and why? Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2008;78(1):11–9.

253. Geschwind DH. Advances in autism. Medicine. 2009;60(1):367–80.

254. Hava G, Vered L, Yael M, Mordechai H, Mahoud H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. Dev Psychobiol. 2006;48(2):162–8.

255. Xuan ICY, Hampson DR. Gender-dependent effects of maternal immune activation on the behavior of mouse offspring. PLoS One. 2014;9(8).

256. Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP. Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: Impact of social versus isolate housing of subjects and partners. Dev Psychobiol. 2004;45(3):153–62.

257. Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. J Neurosci. 2007;27(40):10695–702.

258. Quan N, Herkenham M. Connecting cytokines and brain: a review of current issue. Histol Histopathol. 2002;17:273–8.

259. Lin CY, Lee CH, Chang YW, Wang HM, Chen CY, Chen YH. Pheophytin a inhibits inflammation via suppression of LPS-induced nitric oxide synthase-2, Prostaglandin E2, And interleukin-1β of macrophages. Int J Mol Sci. 2014;15(12):22819–34.

260. Weiser MJ, Mucha B, Denheyer H, Atkinson D, Schanz N, Vassiliou E, et al. Dietary docosahexaenoic acid alleviates autistic-like behaviors resulting from maternal immune activation in mice. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2016;106:27–37.

261. Orr S, Bazinet R. The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation. Curr Opin Investig Drugs. 2008;9(7):735–43.

262. Chalon S. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2006;75(4–5):259–69.

263. Zimmer L, Delpal S, Guilloteau D, Aioun J, Durand G, Chalon S, et al. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. Neurosci Lett. 2000;284(1–2):25–8.

264. Aïd S, Vancassel S, Poumès-Ballihaut C, Chalon S, Guesnet P, Lavialle M. Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. J Lipid Res. 2003;44(8):1545–51.

265. Larrieu T, Hilal LM, Fourrier C, Smedt-Peyrusse V, Sans N, Capuron L, et al. Nutritional omega-3 modulates neuronal morphology in the prefrontal cortex along with depression-related behavior through corticosterone secretion. Transl Psychiatry. 2014;4(9):1–9.

266. Larrieu T, Madore C, Joffre C, Layé S. Nutritional n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency alters cannabinoid receptor signaling pathway in the brain and associated anxiety-like behavior in mice. J Physiol Biochem. 2012;68(4):671–81.

267. Jones ML, Mark PJ, Waddell BJ. Maternal omega-3 fatty acid intake increases placental labyrinthine antioxidant capacity but does not protect against fetal growth restriction induced by placental ischaemia-reperfusion injury. Reproduction. 2013;146(6):539–47.

268. Degroote S, Hunting D, Takser L. Periconceptional folate deficiency leads to autism-like traits in Wistar rat offspring. Neurotoxicol Teratol. 2018;66:132–8.

269. Li Q, Leung YO, Zhou I, Ho LC, Kong W, Basil P, et al. Dietary supplementation with n-3 fatty acids from weaning limits brain biochemistry and behavioural changes elicited by prenatal exposure to maternal inflammation in the mouse model. Transl Psychiatry. 2015;5(9):1–10.

270. Katherine M. Stereotypic Movement Disorders. Semin Pediatr Neurol. 2018;25:19–24.

271. Jolles J, Rompa-Barendregt J, Gispen WH. Novelty and grooming behavior in the rat. Behav Neural Biol. 1979;25(4):563–72.

272. Kirsten TB, Chaves-Kirsten GP, Chaible LM, Silva AC, Martins DO, Britto LRG, et al. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. J Neurosci Res. 2012;90(10):1903–12.

273. Kirsten TB, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. Behav Brain Res. 2017;331(May):25–9.

274. Presti MF, Gibney BC, Lewis MH. Effects of intrastriatal administration of selective dopaminergic ligands on spontaneous stereotypy in mice. Physiol Behav. 2004;80(4):433–9.

275. Garbett KA, Hsiao EY, Kálmán S, Patterson PH, Mirnics K. Effects of maternal immune activation on gene expression patterns in the fetal brain. Transl Psychiatry. 2012;2(e98):1–8.

276. Matsui F, Hecht P, Yoshimoto K, Watanabe Y, Morimoto M, Fritsche K, et al. DHA Mitigates Autistic Behaviors Accompanied by Dopaminergic Change in a Gene/Prenatal Stress Mouse Model. Neuroscience. 2018;371:407–19.

277. Kokacya MH, Copoglu US, Dokuyucu R, Inanir S, Erbas O. The Antipsychotic Effects of Omega-3 Fatty Acids in Rats. Am J Med Sci. 2015;350(3):212–7.

278. Amminger GP, Berger GE, Schäfer MR, Klier C, Friedrich MH, Feucht M. Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Children with Autism: A Double-blind Randomized, Placebo-controlled Pilot Study. Biol Psychiatry. 2007;61(4):551–3.

279. Carletti JV, Deniz BF, Miguel PM, Rojas JJ, Kolling J, Scherer EB, et al. Folic acid prevents behavioral impairment and Na+,K+-ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia. Neurochem Res. 2012;37(8):1624–30.

280. Soto AMS, Kirsten TB, Reis-Silva TM, Martins MFM, Teodorov E, Flório JC, et al. Single early prenatal lipopolysaccharide exposure impairs striatal monoamines and maternal care in female rats. Life Sci. 2013;92(14–16):852–

8.

281. Grzadzinski R, Huerta M, Lord C. DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): An opportunity for identifying ASD subtypes. Mol Autism. 2013;4(12):1–6.

282. Vojtechova I, Petrasek T, Maleninska K, Brozka H, Tejkalova H, Horacek J, et al. Neonatal immune activation by lipopolysaccharide causes inadequate emotional responses to novel situations but no changes in anxiety or cognitive behavior in Wistar rats. Behav Brain Res. 2018;349(April):42–53.

283. Tenk CM, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Sexually dimorphic effects of neonatal immune system activation with lipopolysaccharide on the behavioural response to a homotypic adult immune challenge. Int J Dev Neurosci. 2008;26(3–4):331–8.

284. Lynn DA, Brown GR. The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (Rattus norvegicus). Dev Psychobiol. 2009;51(6):513–20.

285. Engeland CG, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Influence of the estrous cycle on tolerance development to LPS-induced sickness behaviors in rats. Psychoneuroendocrinology. 2006;31(4):510–25.

286. Canever L, Freire TG, Mastella GA, Damázio L, Gomes S, Fachim I, et al. Changes in behavioural parameters, oxidative stress and neurotrophins in the brain of adult offspring induced to an animal model of schizophrenia: The effects of FA deficient or FA supplemented diet during the neurodevelopmental phase. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2018;86(2017):52–64.

287. Li W, Li Z, Li S, Wang X, Wilson JX, Huang G. Periconceptional folic acid supplementation benefit to development of early sensory-motor function through increase DNA methylation in rat offspring. Nutrients. 2018;10(3):1–10.

288. Julvez J, Fortuny J, Mendez M, Torrent M, Ribas-Fitó N, Sunyer J. Maternal use of folic acid supplements during pregnancy and four-year-old neurodevelopment in a population-based birth cohort. Paediatr Perinat Epidemiol. 2009;23(3):199–206.

289. Roth C, Magnus P, Schjølberg S, Stoltenberg C, Surén P, McKeague IW, et al. Folic Acid Supplements in Pregnancy and Severe Language Delay in Children. Jama. 2011;306(14):1566–73.

290. Veena SR, Krishnaveni G V, Srinivasan K, Wills AK, Muthayya S, Kurpad A V, et al. Higher maternal plasma folate but not vitamin B-12 concentrations during pregnancy are associated with better cognitive function scores in 9- to 10-year-old children in South India. J Nutr. 2010;140(5):1014–22.

291. Chatzi L, Papadopoulou E, Koutra K, Roumeliotaki T, Georgiou V, Stratakis N, et al. Effect of high doses of folic acid supplementation in early pregnancy on

child neurodevelopment at 18 months of age: the mother-child cohort “Rhea” study in Crete, Greece. Public Health Nutr. 2012;15(9):1728–36.

292. Villamor E, Rifas-Shiman SL, Gillman MW, Oken E. Maternal intake of methyl-donor nutrients and child cognition at 3 years of age. Pediatr Perinat Epidemiol. 2012;26(4):328–35.

293. Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. Neurosci Biobehav Rev. 2008;32(5):1055–70.

294. Levy S, Mandell D, Schultz R. Autism. Lancet. 2009;374(9701):1627–38.

295. Wischhof L, Irrsack E, Osorio C, Koch M. Prenatal LPS-exposure - a neurodevelopmental rat model of schizophrenia - differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2015;57:17–30.

296. Howland JG, Cazakoff BN, Zhang Y. Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, and locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. Neuroscience. 2012;201:184–98.

297. Jenkins TA, Harte MK, Stenson G, Reynolds GP. Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. Behav Brain Res. 2009;205(2):355–9.

298. Klement D, Blahna K, Nekovérová T. Novel behavioral tasks for studying spatial cognition in rats. Physiol Res. 2008;57(3):161–5.

299. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. New York: Laredo; 1999. 285-93 p.

300. Rose S, Melnyk S, Pavliv O, Bai S, Nick TG, Frye RE, et al. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. Transl Psychiatry. 2012;2(7):e134-8.

301. Chauhan A, Gu F, Essa MM, Wegiel J, Kaur K, Brown WT, et al. Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. J Neurochem. 2011;117(2):209–20.

302. Réus GZ, Maciel AL, Abelaira HM, de Moura AB, de Souza TG, dos Santos TR, et al. ω-3 and Folic Acid Act Against Depressive-Like Behavior and Oxidative Damage in the Brain of Rats Subjected To Early- or Late-Life Stress. Nutrition. 2018;53:120–33.

303. Labrousse VF, Leyrolle Q, Amadieu C, Aubert A, Sere A, Coutureau E, et al. Dietary omega-3 deficiency exacerbates inflammation and reveals spatial memory deficits in mice exposed to lipopolysaccharide during gestation. Brain Behav Immun. 2018;73(April):427–40.

304. Zhou J, Liu A, He F, Jin Y, Zhou S, Xu R, et al. High prevalence of serum folate receptor autoantibodies in children with autism spectrum disorders. Biomarkers. 2018;0(0):1–9.

305. Rao S, Joshi S, Kale A, Hegde M, Mahadik S. Maternal folic acid supplementation to dams on marginal protein level alters brain fatty acid levels of their adult offspring. Metabolism. 2006;55(5):628–34.

306. Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. Biochem Pharmacol. 2002;64(5–6):1037–48.

307. Kale A, Naphade N, Sapkale S, Kamaraju M, Pillai A, Joshi S, et al. Reduced folic acid, vitamin B12and docosahexaenoic acid and increased homocysteine and cortisol in never-medicated schizophrenia patients: Implications for altered one-carbon metabolism. Psychiatry Res. 2010;175(1–2):47–53.

308. Ebara S. Nutritional role of folate. Congenit Anom. 2017;57(5):138–41.

309. Keunen K, Van Elburg RM, Van Bel F, Benders MJNL. Impact of nutrition on brain development and its neuroprotective implications following preterm birth. Pediatr Res. 2015;77(1):148–55.

310. Levitsky D, Strupp B. Malnutrition and the Brain: Changing Concepts, Changing Concerns1. J Nutr. 1995;125(Suppl):2212–20.

311. Penido AB, Rezende GHS, Abreu RV, Oliveira ACP, Guidine PAM, Pereira GS, et al. Malnutrition during central nervous system growth and development impairs permanently the subcortical auditory pathway. Nutr Neurosci. 2012;15(1):31–6.

312. Schwarz JM, Sholar PW, Bilbo SD. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. J Neurochem. 2012;120(6):948–63.

313. Hanamsagar R, Bilbo SD. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. J Steroid Biochem Mol Biol. 2016;169:127–33.

314. Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor β. Endocrinology. 2004;145(11):5021–32.

315. Kentner AC, McLeod SA, Field EF, Pittman QJ. Sex-dependent effects of neonatal inflammation on adult inflammatory markers and behavior. Endocrinology. 2010;151(6):2689–99.

316. Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. Pediatr Res. 2009;65(6):591–8.

317. Evans SC, Boan AD, Bradley C, Carpenter LA. Sex/Gender Differences in

Screening for Autism Spectrum Disorder: Implications for Evidence-Based Assessment. J Clin Child Adolesc Psychol. 2018;0(0):1–15.

318. Hattier MA, Matson JL, Tureck K, Horovitz M. The effects of gender and age on repetitive and/or restricted behaviors and interests in adults with autism spectrum disorders and intellectual disability. Res Dev Disabil. 2011;32(6):2346–51.

319. Mandy W, Chilvers R, Chowdhury U, Salter G, Seigal A, Skuse D. Sex differences in autism spectrum disorder: Evidence from a large sample of children and adolescents. J Autism Dev Disord. 2012;42(7):1304–13.

320. Hiller RM, Young RL, Weber N. Sex differences in pre-diagnosis concerns for children later diagnosed with autism spectrum disorder. Autism. 2016;20(1):75–84.

ANEXO

ANEXO A - PARECER APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 20 de março de 2017
Registro na CEUA (código): 16.045.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Jucélia Jeremias Fortunato

Prezado(a),

Viemos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do potencial neuroprotetor do ômega-3 do ácido fólico isolados ou em combinação em modelo animal de transtorno do espectro autista", registrada com o nº16.045.4.01.IV, sob a responsabilidade de Jucélia Jeremias Fortunato - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 11/04.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Palhoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 20 de março de 2017

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do potencial neuroprotetor do ômega-3 do ácido fólico isolados ou em combinação em modelo animal de transtorno do espectro autista", registrada com o no 16.045.4.01.IV, sob a responsabilidade de Jucélia Jeremias Fortunato - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de11/04.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro/2017 a Janeiro/2018
Espécie/linhagem/raça	*Rattus norvegicus*, ratos Wistar
No de animais	97
Peso/Idade	60 e 22 dias/ 250-330g/100-150g
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério da Universidade do vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina

Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Palhoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br